

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)(51) Internationale Patentklassifikation 5 :  
C12N 15/12, 15/63, 15/67  
C12N 15/85, C07K 13/00  
A61K 37/02

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/05786

(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum: 17. März 1994 (17.03.94)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02295

(22) Internationales Anmeldedatum: 26. August 1993 (26.08.93)

(30) Prioritätsdaten:  
P 42 28 457.0 27. August 1992 (27.08.92) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEI-  
ERSDORF AG [DE/DE]; Unnastraße 48, D-20253  
Hamburg (DE). GESELLSCHAFT FÜR BIOTECH-  
NOLOGISCHE FORSCHUNG MBH [DE/DE];  
Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : EICHNER, Wolfram  
[DE/DE]; Dorotheenstraße 49, D-22301 Hamburg (DE).  
ACHTERBERG, Volker [DE/DE]; Eimsbütteler Markt-  
platz 11, D-20257 Hamburg (DE). DÖRSCHNER, Alb-  
recht [DE/DE]; Schanzenstraße 107, D-20357 Hamburg  
(DE). MEYER-INGOLD, Wolfgang [DE/DE]; Am Ha-  
senkamp 29, D-22457 Hamburg (DE). MIELKE, Heiko  
[DE/DE]; Fischbeker Straße 22, D-21629 Neu Wulm-  
storf (DE). DIRKS, Wilhelm [DE/DE]; Bültenweg 13,  
D-38106 Braunschweig (DE). WIRTH, Manfred [DE/DE]; Marktstraße 1, D-38300 Wolfenbüttel (DE). HAU-  
SER, Hansjörg [DE/DE]; Georg-Westermannallee 29,  
D-38104 Braunschweig (DE).(74) Anwalt: VOELKER, Ingeborg; Uexküll & Stolberg, Bese-  
lerstr. 4, D-22607 Hamburg (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, HU, JP, KZ, PL, RU,  
US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

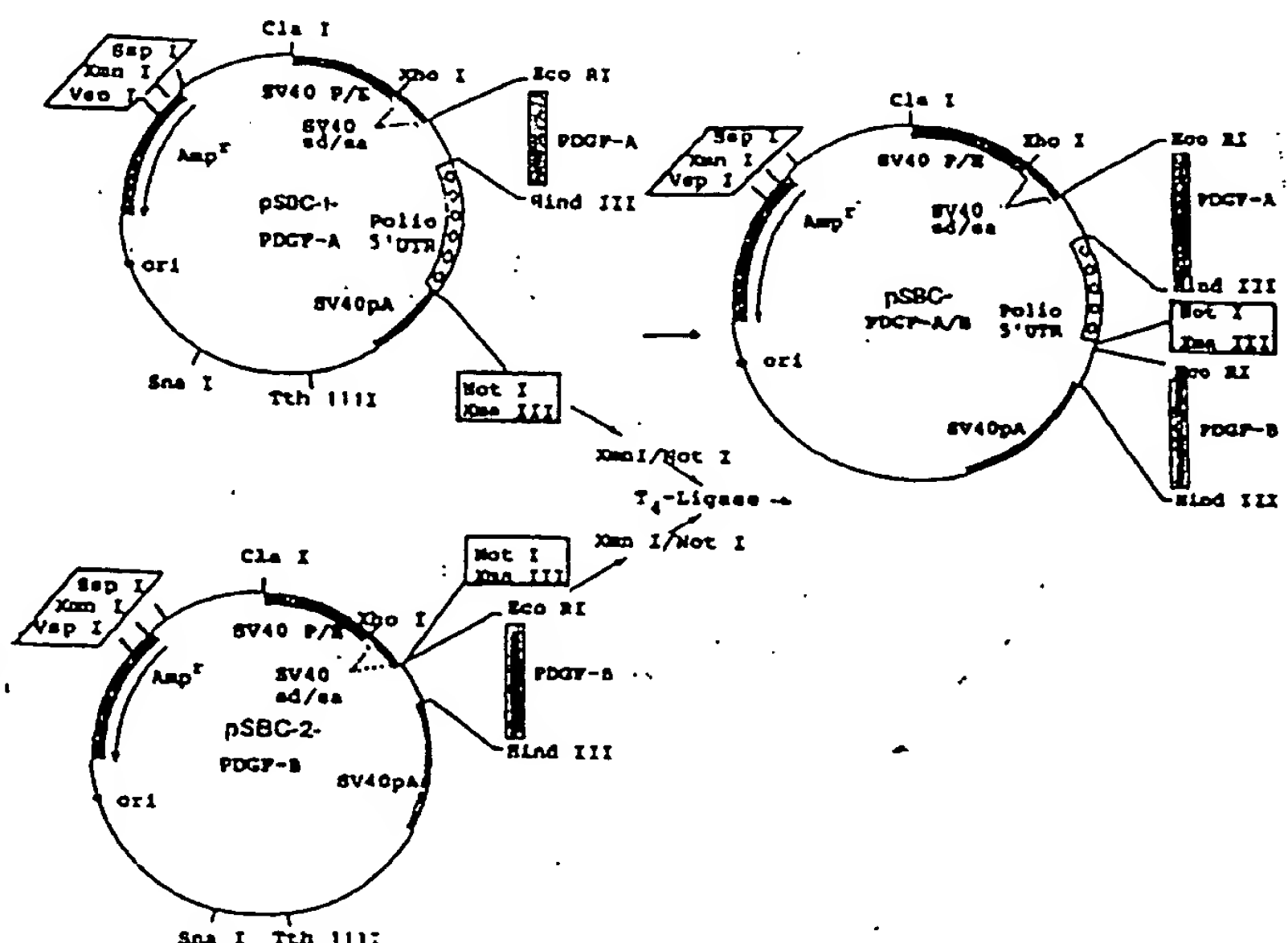
(54) Title: PRODUCTION OF HETERODIMER PDGF-AB BY MEANS OF A BICISTRONIC VECTOR SYSTEM IN  
MAMMALIAN CELLS(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG VON HETERODIMEREM PDGF-AB MIT HILFE EINES BICISTRONISCHEN VEK-  
TORSYSTEMS IN SÄUGERZELLEN

(57) Abstract

The recombinant production of PDGF-AB in mammalian cells is disclosed by means of a bicistronic vector system in which an IRES sequence is located between the first and second cistrons and in which the B chain coding gene is located in the first cistron. The disclosed expression unit allows the equimolar expression of the A and B polypeptide chains.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die rekombinante Herstellung von PDGF-AB in Säugerzellen unter Verwendung eines bicistronischen Vektorsystems, in welchem sich zwischen dem ersten und dem zweiten Cistron eine IRES-Sequenz befindet und das für die B-Kette codierende Gen in dem ersten Cistron positioniert ist. Die erfindungsgemäße Expressionseinheit führt zu einer äquimolaren Expression der Polypeptidketten A und B.



# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                                |    |                                   |    |                                |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich                     | FI | Finnland                          | MR | Mauritanien                    |
| AU | Australien                     | FR | Frankreich                        | MW | Malawi                         |
| BB | Barbados                       | GA | Gabon                             | NE | Niger                          |
| BE | Belgien                        | GB | Vereinigtes Königreich            | NL | Niederlande                    |
| BF | Burkina Faso                   | GN | Guinea                            | NO | Norwegen                       |
| BG | Bulgarien                      | GR | Griechenland                      | NZ | Neuseeland                     |
| BJ | Benin                          | HU | Ungarn                            | PL | Polen                          |
| BR | Brasilien                      | IE | Irland                            | PT | Portugal                       |
| BY | Belarus                        | IT | Italien                           | RO | Rumänien                       |
| CA | Kanada                         | JP | Japan                             | RU | Russische Föderation           |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SD | Sudan                          |
| CG | Kongo                          | KR | Republik Korea                    | SE | Schweden                       |
| CH | Schweiz                        | KZ | Kasachstan                        | SI | Slowenien                      |
| CI | Côte d'Ivoire                  | LI | Liechtenstein                     | SK | Slowakische Republik           |
| CM | Kamerun                        | LK | Sri Lanka                         | SN | Senegal                        |
| CN | China                          | LU | Luxemburg                         | TD | Tschad                         |
| CS | Tschechoslowakei               | LV | Lettland                          | TG | Togo                           |
| CZ | Tschechische Republik          | MC | Monaco                            | UA | Ukraine                        |
| DE | Deutschland                    | MG | Madagaskar                        | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| DK | Dänemark                       | ML | Mali                              | UZ | Usbekistan                     |
| ES | Spanien                        | MN | Mongolei                          | VN | Vietnam                        |

Herstellung von heterodimerem PDGF-AB mit Hilfe eines  
bicistronischen Vektorsystems in Säugerzellen

Die Erfindung betrifft die rekombinante Herstellung von PDGF-AB (rPDGF-AB) in Säugerzellen als Wirtszellen, welches im wesentlichen frei ist von den homodimeren Begleitprodukten PDGF-AA und -BB .

Seit vielen Jahren ist es möglich, einzelne Proteine, deren Gene durch Klonierung isoliert wurden, nach Manipulation und Gentransfer in verschiedenen prokaryontischen und eukaryontischen Zellen herzustellen. Für das Erreichen der vollen biologischen Aktivität vieler Proteine sind korrekte Faltungen, richtiges Prozessieren und gegebenenfalls auch posttranslationale Modifikationen erforderlich, welche in prokaryontischen und niederen eukaryontischen Expressionssystemen oftmals nicht korrekt ausgeführt werden. Aus diesem Grund bedient man sich häufig Säugerzellen als Wirte. Säugerzellen sind darüber hinaus in der Lage, große Mengen von Proteinen zu sekretieren.

Aus verschiedenen Gründen bedarf es oftmals der simultanen Herstellung zweier oder mehrerer Proteinketten. Zum Beispiel sind viele natürliche Proteine in ihrer funktionellen Form aus

mehreren Untereinheiten zusammengesetzt (z.B. Antikörper). Natürlichlicherweise erfolgt die Assoziation verschiedener Untereinheiten von komplexen Proteinen nach der Proteinsynthese. An dieser Assoziation sind häufig andere Komponenten des zellulären Apparates als Katalysatoren oder Kontrollelemente beteiligt, wobei es gelegentlich auch zu Umfaltungen der ursprünglichen Strukturen kommt. Störungen der Assoziation, z.B. durch ungleiche Synthese der einzelnen Komponenten, können sowohl für die zu bildenden Proteine als auch für die Wirtszelle negative Konsequenzen haben. Natürlichlicherweise unterliegt dieses System einer ausgefeilten, meist zellspezifischen Regulation. Da diese Regulation in genetisch manipulierten Zellen im allgemeinen nicht nachstellbar ist, wurden die nachfolgend erläuterten Alternativen zur simultanen Herstellung mehrerer Fremdproteine entwickelt und angewandt:

- 1) Die Gene werden getrennt in Expressionsvektoren integriert und dann in einem geeigneten Verhältnis in die Zellen cotransferiert. Dies setzt voraus, daß mehrere Plasmidkopien gleichzeitig stabil aufgenommen und bei der Teilung weitergetragen werden. Das Verhältnis der Expression der verschiedenen Gene zueinander hängt sowohl von der Kopienzahl als auch von der Integrationsstelle im Genom der Wirtszelle ab. Durch aufwendige Screeningverfahren ist es möglich, Zellklone zu isolieren, welche die einzelnen Genprodukte im gewünschten Verhältnis zueinander exprimieren.
- 2) Um die Kopienzahl zu nivellieren, werden die verschiedenen Gene in unabhängigen Transkriptionseinheiten auf einem Vektor plazierte. Dies sichert weitgehend die stöchiometrische Repräsentanz der Gene, aber auch dieses Verfahren ist mit Problemen behaftet. Selbst wenn nämlich Expressionseinheiten mit Promotoren gleicher Stärke verwendet werden, ist keineswegs sichergestellt, daß die mRNAs, welche für die verschiedenen Proteine kodieren, die gleiche Stabilität und Translationseffizienz aufweisen. Auch die Transkriptionseffizienz

5 beider Gene muß nicht zwangsläufig identisch sein. In diesem Fall wird mit Hilfe von gentechnischen Tricks (Positionierung der Transkriptionseinheiten zueinander, Modulation der Stärke der einzelnen Promotoren durch Wegnehmen oder Hinzufügen einzelner Elemente) die Stöchiometrie der Expression schrittweise hergestellt.

10 3) Zur Vermeidung der Probleme im Zusammenhang mit der Stabilität der mRNA verschiedener Transkripte wurden bi- oder multicistronische Vektoren entwickelt. Hierzu liegen die einzelnen Leseraster der die Proteinketten kodierenden Genabschnitte - Cistrons - auf einer Transkriptionseinheit (Expressionseinheit). Die Expression des multicistronischen Gens erfolgt durch einen einzigen Promotor. Bei derartigen  
15 Vektoren wird normalerweise das erste Cistron sehr effizient translatiert, die nachfolgenden aber in Abhängigkeit von den intercistronischen Sequenzen. Verwendet man für diese intercistronischen Sequenzen normale 5' nicht translatierte Sequenzen (5'UTR) aus monocistronischen Genen, so ist die  
20 Expression des nachfolgenden Cistrons meist sehr niedrig (in der Regel um 0,5 bis 2% der Translation des ersten Cistrons, Kaufman et al., 1987; Boel et al., 1987). Diese Effizienz konnte zunächst durch Einfügen von Leadersequenzen (High Efficiency Leaders, HEL) auf etwa 20% gesteigert werden. Mit  
25 der Entdeckung und Verwendung von bestimmten zellulären und viralen Sequenzen, welche eine interne Translationsinitiation ermöglichen (IRES; Jackson et al., 1990), war es möglich, ein Translationsverhältnis zwischen dem ersten und dem nachfolgenden Cistron von 3:1 zu erzielen.

30 Die Schlüsselrolle bei der Verwendung bi- oder multicistronischer Vektoren spielt die Translation. Normalerweise erfolgt die Initiation der Translation in Eukaryonten nach dem "cap"-abhängigen Mechanismus, im Verlaufe dessen ein Prä-Initiationskomplex  
35 aus Proteinen und RNA am 5'Ende einer mRNA mit "cap" (methyliertes Nukleotid) aufgebaut wird. Von dort aus wird ein geeignetes

Translationsinitiationskodon ausgesucht, von dem ausgehend die Translation gestartet wird. Man glaubt, daß dies über einen "Scanning"-Prozeß abläuft, wobei sich der Prä-Initiationskomplex entlang der mRNA in 3'Richtung bewegt. Auf diese Weise wird, von einigen Ausnahmen abgesehen, immer das am 5'Ende liegende Cistron effizient translatiert (Kozak, 1989). Alle nachfolgenden Cistrons werden gar nicht oder sehr ineffizient translatiert. Die Translations-Effizienz der nachfolgenden Cistrons konnte durch Optimierung des Abstandes zwischen den Genen (intercistronische Regionen; Kozak, 1987; Wirth et al., 1991) oder durch Verwendung von sogenannten "high efficiency leader"-Sequenzen (HEL, s.o.) verbessert werden (z.B. Falcone und Andrews, 1991 und Ref. darin). HEL's sind solche 5'nicht translatierten Bereiche von Genen oder auch anderen Sequenzen, welche die Initiation der "cap"-abhängigen Translation stimulieren. Auch bei derartigen Konstrukten sind jedoch die erreichbaren Expressionswerte für das zweite und die nachfolgenden Cistrons immer deutlich geringer als die des "cap"-abhängig regulierten ersten Cistrons.

20

Ein in den letzten Jahren aufgedeckter Mechanismus zur internen Translationsinitiation benutzt spezifische Nukleinsäuresequenzen. Zu diesen Sequenzen zählen die nicht translatierten Bereiche einzelner Picorna-Viren, z.B. Polio-Virus, Encephalomyocarditis-Virus, (Pelletier und Sonenberg, 1988; Jang et al., 1988; Jang et al., 1989) sowie einiger zellulärer Proteine, z.B. BiP (Macejak und Sarnow, 1991). Bei den Picorna-Viren sorgt ein kurzer Abschnitt des 5'nicht translatierten Bereichs, das sogenannte IRES (internal ribosomal entry site), für die interne Bindung eines Prä-Initiationskomplexes. Darüber hinaus sind weitere Bereiche aus dieser Region für die effiziente Initiation dieser Translation notwendig. So zeigt es sich z.B., daß für eine effiziente Translation nicht nur die 400 Basenpaare stromaufwärts des IRES, sondern auch der extreme 5'Teil der Picorna-Virus nicht-translatierten Region notwendig ist (Simoes und Sarnow, 1991). Auf der anderen Seite führt das "capping", die Voraus-



setzung für den normalen Initiationsmechanismus der Translation, zu einer Reduktion der Effizienz der internen Initiation von Polio-Virus IRES, wenn er am 5'Ende einer entsprechenden mRNA lokalisiert ist (Hambidge und Sarnow, 1991). Der negative Effekt wird aufgehoben, wenn die IRES für die Initiation des zweiten Cistrons verantwortlich ist, also zwischen "cap" und IRES ein Cistron liegt.

IRES-Elemente können also als Initiatoren für die effiziente Translation von Leserastern fungieren. Dabei beeinflussen sie die "cap"-abhängige Translation des ersten Cistrons nicht. Auch umgekehrt scheint eine Beeinflussung der IRES-abhängigen Initiation unabhängig von der "cap"-abhängigen Translationsinitiation zu sein. Die Mechanismen beider Vorgänge unterscheiden sich auch deutlich in der Verwendung verschiedener zellulärer Faktoren (Meerovitch et al., 1989; Jang und Wimmer, 1990). In der vergangenen Zeit wurden mehrere Untersuchungen publiziert, bei denen bicistronische Expressionsplasmide verwendet wurden (Adam et al., 1991; Ghattas et al., 1991; Kaufman et al., 1991; Wood et al., 1991; Wirth et al., 1991). Da aber offensichtlich die "cap"-abhängige Translation stärker ist als die IRES-abhängige Translation, konnte eine stöchiometrische Expression zweier Proteinketten nicht erreicht werden. Die bisherigen Verwendungen konzentrierten sich deshalb auf die Verwendung von Selektionsmarkern im zweiten Cistron. Die enge Expressionskoppelung des Selektionsmarkers mit dem zu exprimierenden Gen, welches das erste Cistron darstellt, ist besonders vorteilhaft bei der Selektion auf Hochexpression, insbesondere, wenn eine vorausgehende Genamplifikation erforderlich ist.

Die Synthese äquimolarer Proteinmengen von bi- oder multicistronischen Expressionsvektoren ist jedoch bisher nicht erreicht worden. Die äquimolare Expression zweier verschiedener Proteinketten ist für die rekombinante Herstellung des Wachstumsfaktors aus Blutplättchen, "Platelet-Derived-Growth-Factor" (PDGF), einem der Hauptmitogene im menschlichen Blutserum, von besonde-

rer Bedeutung. Aus menschlichen Thrombozyten aufgereinigtes PDGF besteht aus zwei unterschiedlichen, aber nahe verwandten Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Unter reduzierenden Bedingungen zerfällt das dimere PDGF in seine monomeren Untereinheiten, wovon die größere ( $M_r$  15-17.000 D) als PDGF-A-Kette und die kleinere ( $M_r$  14.000 D) als PDGF-B-Kette bezeichnet wurde (Johnsson et al., 1984).

Die Proteinketten PDGF-A und -B werden von verschiedenen Genen kodiert. Die vollständige Struktur beider Genprodukte konnte durch cDNA-Klonierung aufgeklärt werden (Ratner et al., 1985, Betsholtz et al., 1986). Dabei zeigte es sich, daß beide PDGF-Moleküle zunächst als ungewöhnlich lange Vorläufermoleküle, sog. Precursoren, synthetisiert und anschließend intrazellulär zu den reifen PDGF-Ketten prozessiert werden. Durch alternatives Spleißen lassen sich zwei verschiedene PDGF-A-Transkripte erklären, die sich durch An- oder Abwesenheit eines 69-bp Segmentes im 3'-Bereich unterscheiden (Betsholtz et al., 1986; Wise et al., 1989). Durch dieses Insert kommt es zu einer Änderung im codierenden Abschnitt mit der Folge, daß eine kurze (PDGF-A<sub>K</sub>, 110 Aminosäuren) und eine lange (PDGF-A<sub>L</sub>, 125 Aminosäuren) Form der PDGF-A-Kette gebildet wird. Beide Varianten sind als normale zelluläre Proteine nebeneinander nachweisbar, wobei die kürzere Form die häufigere Spezies ist (Matoskova et al., 1989; Young et al., 1990).

Beide Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert und zeigen einen hohen Homologiegrad. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigt, daß beide Gene unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Eine Folge davon ist, daß beide PDGF-Ketten natürlicherweise in verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichem Verhältnis zueinander produziert werden.

Alle drei möglichen Isoformen des PDGF (AA, AB und BB) kommen natürlicherweise vor und sind in Thrombozyten in sogenannten  $\alpha$ -Granula gespeichert. Aus überlagerten menschlichen Blutplätt-



chen kann neben dem die Hauptmenge bildenden PDGF-AB Heterodimer auch PDGF-BB zu etwa 30 % isoliert werden (Hammacher et al., 1988). Frisch präparierte Blutplättchen enthalten auch einen hohen Anteil (27%) an PDGF-AA (Hart et al., 1990). Es kann daher angenommen werden, daß in den Vorläuferzellen der Thrombozyten, den Megakaryozyten, der Anteil beider Homodimere zusammen etwa dem AB-Heterodimer-Anteil entspricht. Da die Konzentration jeder PDGF-Spezies im Thrombozyten direkt korrelieren sollte mit ihrer individuellen Bedeutung im Wundheilungsgeschehen, kommt insbesondere der häufigsten Isoform, dem PDGF-AB, eine herausragende Bedeutung auf der Suche nach einem "Wundheilungshormon" zu.

Jede der verschiedenen Isoformen besitzt biologische Aktivität *in vitro*. Erst die Verfügbarkeit der hochreinen, rekombinanten PDGF-Isoformen (Hoppe et al., 1989; Hoppe et al., 1990) machte vergleichende Studien zur Differenzierung der unterschiedlichen Wirkungsspektren der verschiedenen PDGF-Spezies möglich. Inzwischen belegen eine Reihe von Untersuchungen die unterschiedliche Potenz von PDGF-AA, AB und BB im Chemotaxis- und DNA-Proliferationsstest (Hosang et al., 1989; Nister et al., 1988; Reilly & Broski, 1989; Siegbahn et al., 1990), sowie deren unterschiedlichen Einfluß auf die Freisetzung von Inositol-1,4,5-trisphosphat, Produktion von Diacylglycerol und  $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung (Block et al., 1989; Sachinidis et al., 1990 A, 1990 B). Zwei unterschiedliche PDGF-Rezeptorpopulationen, von denen der PDGF- $\alpha$ -Rezeptor alle PDGF-Isoformen und der  $\beta$ -Rezeptor nur PDGF-BB bindet (Hart et al., 1988; Heldin et al., 1988) liefern eine plausible Erklärung dafür, wie sich Wirkungsunterschiede der PDGF-Isoformen über deren unterschiedliche Potenz zur Rezeptoraktivierung entfalten können. Die meßbaren unterschiedlichen *in vitro*-Effekte der PDGF-Isoformen, zusammen mit dem Nachweis zweier verschiedenener Rezeptorpopulationen, lassen Rückschlüsse auf unterschiedliche *in vivo* Wirkungsspektren von PDGF-AA, AB und BB zu. Daher ist die Produktion von reinem PDGF-AB, ohne PDGF-BB oder PDGF-AA als Begleitproteine, wünschenswert. Um ein homogenes, gut charakterisiertes Heterodimer zu erhalten, müßten

die Homodimere sonst durch Reinigung vollständig eliminiert werden, was durch die sehr ähnlichen chromatographischen Eigenschaften aller PDGF Spezies zusätzlich erschwert wird.

- 5 Eine Reihe verschiedener Wege zur Herstellung von rekombinanten PDGF-Homodimeren, insbesondere PDGF-BB, sind zum Teil schon seit längerer Zeit bekannt (Kelly et al., 1985; Heldin et al., 1986; Hoppe et al., 1989; Beckmann et al., 1988; Bywater et al., 1988; Stroobant & Waterfield 1984). Ein Herstellungsverfahren für  
10 hochreines PDGF-AB wurde von Hoppe et al. (1990, s.a. PCT/EP 90/00 063) beschrieben. Hier werden die getrennt in unterschiedlichen E.coli-Zellen hergestellten, inaktiven Monomere durch in vitro-Renaturierung in biologisch aktives PDGF-AB überführt.
- 15 Die bislang synthetisierten Genprodukte der drei PDGF-Isoformen weisen, trotz variierender Länge der A- bzw. B-Einzelstränge, weitgehend übereinstimmende biologische Aktivität auf.

Für die heterologe Expression von PDGF-AB Heterodimeren in eukaryontischen Systemen gelten die eingangs erwähnten Kriterien der  
20 simultanen Expression zweier (oder mehrerer) Proteine. Die bisher publizierten Strategien zur Herstellung von PDGF-AB in rekombinanten CHO-Zellen (Östman et al., 1988) und mit Hilfe von Hefe-Expressionssystemen [EP 0 259 632] entsprechen dem oben  
25 unter 2) erläuterten Fallbeispiel, wo sich beide PDGF-Gene in unabhängigen Transkriptionseinheiten auf einem Vektor befinden. Die Quantifizierung der auf diese Weise in CHO-Zellen exprimierten unterschiedlichen PDGF-Dimere ergab 19% für PDGF-AA, 69% für PDGF-AB und 12% für PDGF-BB (Östman et al., 1988).

30

Eine Grundvoraussetzung für die bevorzugte Synthese von PDGF-AB Heterodimeren mit Hilfe eukaryontischer Expressionssysteme ist daher nicht nur in der stöchiometrischen Repräsentanz beider Gene, sondern in erster Linie auch in deren koordinierter Expression zu sehen. Daher bieten sich bicistronische Expressions-  
35 einheiten als mögliche Hilfsmittel für die Expression heterodi-

merer Proteine und damit des PDGF-AB an. In WO 90/01550 wird ein derartiges System auch für die Expression von PDGF beschrieben. Wie unter Punkt 3) oben näher erläutert, liefern diese Konstrukte jedoch nur sehr limitierte Expressionsraten für das zweite  
5 (und nachfolgende) Cistron. Abhängig von der im ersten Cistron lokalisierten PDGF-Kette werden vorwiegend Homodimere dieses Typs gebildet. Bisher in der Literatur beschriebene Versuche, beide PDGF-Gene mit Hilfe anderer Expressionssysteme in einer eukaryontischen Zelle zu exprimieren, führten zu Homodimer-Ne-  
10 benproduktanteilen im Bereich von 30% oder mehr. Um dennoch mit diesen Zellsystemen PDGF-AB zu erhalten, müssen aufwendige und extrem verlustreiche Reinigungstechniken angewendet werden.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Expressionssystem zu  
15 schaffen, mit Hilfe dessen PDGF-AB ohne wesentliche Verunreinigung durch die jeweiligen Homopolymere hergestellt werden kann.

Erfindungsgemäß konnte die Aufgabe durch die Verwendung eines Konstrukts gelöst werden, welches in an sich bekannter Weise von  
20 der IRES-Sequenz zwischen dem ersten und zweiten Cistron Gebrauch macht, jedoch das für PDGF-B kodierende Gen in das erste Cistron einbringt. Überraschenderweise hat es sich erfindungsgemäß gezeigt, daß die Wirtszellen nach Transfektion mit diesen Konstrukten PDGF-AB ohne nennenswerten Anteil an Homodi-  
25 meren sezernieren. Ausbeute und Wirtschaftlichkeit der nachgeschalteten Proteinreinigungsverfahren wird dadurch beträchtlich verbessert.

Gegenstand der Erfindung ist demgemäß eine bicistronische Ex-  
30 pressionseinheit zur rekombinanten Herstellung von heterodimerem PDGF-AB in Säugerzellen als Wirtszellen, welche gekennzeichnet ist durch die allgemeine Formel

P - 5'UTR - C<sub>1</sub> - IRES - C<sub>2</sub> - 3'UTR - polyA,

- 10 -

in der

5:

p ein transkriptionaler Promotor ist,

5 5'UTR eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

C<sub>1</sub> ein Cistron ist, welches ein für die B-Kette von PDGF, ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthält,

10

IRES eine Nukleotidsequenz viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs ist, die in der Stufe der Translation für die interne Initiation verantwortlich ist,

15

C<sub>2</sub> ein Cistron ist, welches ein für die A-Kette von PDGF oder ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthält,

20

3'UTR eine nicht translatierte Nukleotidsequenz,  
und polyA ein Polyadenylierungssignal ist,

25

wobei C<sub>1</sub>, IRES und C<sub>2</sub> operativ miteinander verknüpft sind.

Als Promotoren kommen alle diejenigen Promotoren in Betracht, die in eukaryontischen Zellen wirksam sind, d. h., die die Genexpression in eukaryontischen Zellen initiieren können. Insbesondere können alle konstitutiven und induzierbaren Promotoren  
30 viralen (beispielsweise die "Long terminal repeats, LTR's, von Retroviren oder Herpes Simplex Thymidin-Kinase Promotor), zellulären (beispielsweise Interferon- oder Ubiquitin-Promotor) oder synthetischen Ursprungs verwendet werden. Erfindungsgemäß  
35 ist der SV40-Promotor bevorzugt.

Die 5'UTR und die 3'UTR sind beliebige, in der Regel nichttranslatierte Nukleotidsequenzen, die regulierende Elemente enthalten können. Erfindungsgemäß geeignet sind beispielsweise die Sequenzen aus SV-40 nach Artelt et al. (1988).

5

Das erste Cistron, C<sub>1</sub>, kann die vollständige PDGF-B Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 3), deren Analoga und jegliches Fragment enthalten, welches für eine biologisch wirksame PDGF-B Kette kodiert. Insbesondere kommen in diesem Zusammenhang das zur PDGF-B-Kette homologe v-sis-Gen (Produkt des Simian Sarcoma Virus (SSV)) sowie die Basenpaare 283 bis 609 gemäß SEQ ID Nr. 3 in Betracht, welche die reife PDGF-B Kette kodieren.

15 Analog kann das zweite Cistron, C<sub>2</sub>, die lange oder kurze PDGF-A Vorläufersequenz (PDGF-A<sub>L</sub> oder PDGF-A<sub>K</sub> - SEQ ID Nr. 1) sowie jegliche Fragmente enthalten, welche für eine biologisch aktive PDGF-A Kette kodieren. In Betracht kommt insbesondere das Fragment gemäß den Basenpaaren 353 bis 682 gemäß SEQ ID Nr. 1, welches für die reife PDGF-A Kette kodiert.

20

Als IRES können alle diejenigen Sequenzen viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs verwendet werden, welche eine interne Bindung der Ribosomen vermitteln. Beispiele für derartige Sequenzen sind die IRES aus Poliovirus Typ 1 gemäß SEQ ID Nr. 5, 25 welche die ersten 628 Nukleotide der 5' nicht-translatierten Region des Poliovirus Typ 1 einschließt, sowie ferner die 5'UTR des Enzephalomyocarditis Virus (EMV), des "Theilers murine encephalomyelitis virus" (TMEV), des "foot and mouth disease virus" (FMDV), des "bovine enterovirus" (BEV), des "coxsackie B virus" (CBV), des "human rhinovirus" (HRV) und die "human immunoglobulin heavy chain binding protein" (BIP) 5'UTR, die Drosophila Antennapediae 5'UTR, die Drosophila Ultrabithorax 5'UTR oder genetische Hybride oder Fragmente aus den oben angeführten Sequenzen. Erfindungsgemäß bevorzugt ist die IRES aus Poliovirus 30 Typ 1 gemäß SEQ ID Nr. 5.

- 12 -

Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinante DNA Vektoren, welche die erfindungsgemäße Expressionseinheit enthalten. Ein erfindungsgemäß bevorzugter Vektor ist in Figur 4B und dessen Herstellung in den Figuren 1 bis 3 dargestellt.

5

Die Erfindung schließt ferner Wirtszellen ein, welche Säugerzellen sind und mit einem Vektor transformiert sind, der die erfindungsgemäße Expressionseinheit trägt. Vorzugsweise handelt es sich um CHO- oder BHK-Zellen, wobei letztere besonders bevorzugt sind. Eine erfindungsgemäß transformierte BHK-Zelle wurde unter der Bezeichnung 91-21-4D am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) hinterlegt. Ihr wurde die Hinterlegungsnummer DSM ACC2045 zugeteilt.

15 Die Erfindung schließt darüber hinaus Verfahren zur Herstellung von heterodimerem rPDGF-AB ein, in deren Verlauf Säugerzellen als Wirtszellen, welche die erfindungsgemäße Expressionseinheit operativ insertiert enthalten, in einem geeigneten Medium kultiviert werden und das so erzeugte rPDGF-AB von den Zellen und dem  
20 Medium abgetrennt wird. Als Medium kommen alle bekannten Medien zum Kultivieren von Säugerzellen in Betracht, einschließlich synthetischer, proteinfreier oder proteinarmer Produktionsmedien. Erfindungsgemäß wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), angereichert mit 4,5 g/l Glukose und 5 bis 10 % FCS,  
25 bevorzugt.

Das rPDGF-AB wird nach herkömmlichen Verfahren (vgl. beispielsweise Östmann et al. 1988) von den Zellen und dem Medium abgetrennt. Vorzugsweise wird erfindungsgemäß ein für PDGF-AA entwickeltes und hoch effizientes Verfahren (Eichner et al., 1989)  
30 angewendet.

Gegenstand der Erfindung ist schließlich heterodimeres rPDGF-AB, welches im wesentlichen frei ist von homodimeren Begleitprodukten und welches erhältlich ist durch Kultivieren der oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Wirtszellen. Überraschenderweise  
35



hat es sich gezeigt, daß die mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt transformierten Wirtszellen das heterodimere PDGF-AB mit einer Reinheit von 90% und mehr, bezogen auf die Gesamtmenge des gebildeten PDGF, sezernieren. Erfindungsgemäß bevorzugt ist PDGF-AB, welches durch Kultivieren von BHK-Zellen, transformiert mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt, beispielsweise derjenigen Zellen, welche unter der Bezeichnung 91-21-4D am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) hinterlegt wurden (Hinterlegungsnummer DSM ACC2045), zugänglich ist.

Das erfindungsgemäße rPDGF-AB unterscheidet sich von den bisher bekannten rekombinanten PDGF-AB Produkten in erster Linie durch seinen hohen Reinheitsgrad. Wie eingangs ausgeführt, ist bisher kein rekombinantes Verfahren beschrieben worden, bei dem 90% und mehr des erhaltenen Produktes aus dem Heterodimeren besteht. Da die vollständige Abtrennung der Homodimeren von dem Heterodimeren nahezu unmöglich ist, sind die bekannten Produkte zwangsläufig Gemische aus allen 3 Isoformen.

Darüberhinaus haften den bekannten Produkten, abhängig von deren Herstellung, in mehrfacher Hinsicht Nachteile an. So ist es bekannt, daß die heterologe Genexpression in Hefezellen, wie in EP 259 632 oder 288 307 beschrieben, zu Proteinprodukten mit gegenüber dem humanen Produkt veränderten Glykosylierungsmustern führt. Zudem ist in Hefezellen exprimiertes PDGF-B zumindest teilweise unvollständig prozessiert und/oder proteolytisch abgebaut (vgl. WO 912/01716). Derartige Produkte weisen somit ein verändertes Kohlenhydratmuster auf und sie sind mit proteolytischen Abbauprodukten verunreinigt. Zur Vermeidung der vorgenannten Nachteile beschreibt die WO 92/01716 Verfahren zur Herstellung modifizierter PDGF-Ketten, bei denen die Konsensus-Sequenzen für die Glykosylierung bzw. die Protease sensitiven Domänen entfernt sind. Derartige Modifikationen beeinflussen jedoch die biologische Aktivität des Produktes (vgl. WO 92/01716).

- 14 -

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch Kultivieren von erfindungsgemäß transformierten BHK-Zellen, und insbesondere durch Kultivieren der Wirtszellen 91-21-4D mit der Hinterlegungs-Nr.: DSM ACC2045 heterodimeres  
5 rPDGF-AB gewonnen.

Ferner ist aus der WO 90/08163 die rekombinante Herstellung von PDGF-AB in Bakterienzellen, insbesondere in *E. coli* bekannt, welche zwangsläufig zu einem nicht glykosylierten Produkt führt.  
10 Eine nach diesem Verfahren in *E. coli* Zellen exprimierte PDGF-B-Kette ist jedoch aminoterminal um 12 Aminosäuren verkürzt. Darüberhinaus muß das Produkt aus Bakterien *in vitro* renaturiert werden, ein Vorgang, bei dem die korrekte inter- und intramolekulare Bildung der Disulphidbrücken und die korrekte Faltung des  
15 Proteins nicht gewährleistet ist mit der Folge, daß die immunologischen Eigenschaften des Produkts verändert und die biologische Aktivität beeinflußt werden können.

Das heterodimere rPDGF-AB gemäß der Erfindung wird vorzugsweise  
20 zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen als pharmazeutisches Präparat, insbesondere für die Wundheilung formuliert. In diesem Zusammenhang kann es als Wirkstoff in Pflastern, Wundverbänden und dergleichen enthalten sein. Es ist besonders für die topische Verabreichung geeignet, es kommen  
25 jedoch auch Applikationen in Betracht, in deren Verlauf der Wirkstoff in die Wunde eingebracht oder subkutan verabreicht wird. Beispielsweise kann das PDGF-AB in einer geeigneten Matrix mit Depotfunktion im Wundrandbereich subkutan appliziert werden oder direkt subkutan injiziert werden.

30

Ferner eignet sich das erfindungsgemäße rPDGF-AB zur Herstellung von kosmetischen Präparaten, zum Beispiel zur Hautregeneration, zur Hautglättung, zur Verhinderung der Narbenbildung oder der Hautalterung sowie zur Anwendung bei Sonnenbrand.

Geeignete Hilfs- und Trägerstoffe schließen Cellulose-Gele auf wässriger Basis, biologisch abbaubare Polymere sowie jegliche Salben- und Cremebasis und Sprays ein. Ferner können zusätzliche Wirkstoffe, welche die Wundheilung beeinflussen, wie beispielsweise Kollagen, Fibronectin, Faktor XIII, Fibroblasten Wachstumsfaktor (aFGF, bFGF), Transformierender Wachstumsfaktor Typ  $\alpha$  oder  $\beta$ , Epidermis Wachstumsfaktor, Insulin oder "Insulin-like Growth Factor" (IGF I, II) oder weitere Wachstumsfaktoren in den erfindungsgemäßen Präparaten enthalten sein. Die erfindungsgemäßen Produkte können beispielsweise auch in Wundverbänden in wässriger Lösung vorliegen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert:

# 1. Beschreibung der Figuren:

Fig. 1) Schematische Darstellung der Herstellung der Basisvektoren pSBC-1 und pSBC-2.

5

Fig. 2) Vektor M13BCL1; in der Vektorkarte ist der c-sis (PDGF-B) homologe Bereich aus pMVW-2 angegeben. Der Bereich des reifen PDGF-B und der NcoI/SalI (SEQ ID Nr. 8 + 9) Adapter sind durch schwarze Balken hervorgehoben.

10

Fig. 3) Schematische Darstellung der Rekonstruktion der vollständigen PDGF-B-Vorläufersequenz.

15

Fig. 4A +B) Schematische Darstellung der Konstruktion des bicistronischen Vergleichs-Vektors pSBC-A/B (Fig. 4A) und des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSBC-PDGF-B/A (Fig. 4B) aus den Basisvektoren pSBC-1 und pSBC-2. Die Expressionsvektoren pSBC-PDGF-A/B und pSBC-PDGF-B/A unterscheiden sich dabei durch die Orientierung der kodierenden cDNA-Sequenzen der PDGF-A- und -B-Kette, d.h. durch ihre Lokalisierung auf dem Plasmid als in Lese-richtung erstes bzw. zweites Cistron.

20

25

Fig. 5) Northern-Blot Analyse transformierter BHK-Zellen. Es wurde die mRNA aus dem Gesamtpool der BHK-Zellen untersucht, die stabil mit den monocistronischen bzw. bicistronischen PDGF-Expressionskonstrukten transfiziert worden waren. Erwartungsgemäß zeigen die monocistronischen mRNAs eine Größe von etwa 1.300 nt, während bei den bicistronischen mRNAs die Größe der codierenden Sequenzen beider PDGF-Ketten (2.500 Nucleotide) vorhanden ist. Hiermit ist gezeigt, daß die entsprechenden Genprodukte von einer einzigen bicistronischen mRNA abgelesen werden. Als Referenz wurde die murine  $\alpha$ -Actin Probe verwendet [Minty, A.J. et al., J. Biol. Chem. 256, 1008 - 1014, (1981)].

30

35

Fig. 6) Sandwich-ELISA zum Nachweis von PDGF-AB mit Hilfe eines monoklonalen und eines polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpers: Eichkurven von PDGF-Standards.

Polystyrolplatten wurden mit Schaf-Anti-Maus-IgG beschichtet und anschließend mit einem Maus-Hybridoma-Überstand (von Klon 1B3, enthält monoklonale Antikörper gegen die B-Kette in PDGF-AB und -BB) inkubiert; nach Inkubation mit verschiedenen PDGF Standards wurde das gebundene PDGF mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Anti-PDGF-AA, gefolgt von Peroxidase-markiertem Anti-Kaninchen-IgG nachgewiesen;

Quelle der PDGF-Standards:

AB: aus humanen Thrombozyten, von PROMEGA Corp. No. G 5161;

BB: rekombinant aus Hefe, von PROMEGA Corp. No. G 5191;

AA: rekombinant aus BHK-Zellen, ca. 70%<sup>ig</sup> (Eichner et al., 1989).

Für PDGF's aus eukaryontischen Quellen ergibt sich ein spezifisches Signal mit PDGF-AB (aus humanen Thrombozyten) mit einer geringen Kreuzreaktion mit PDGF-BB.

Fig. 7) Nachweis von PDGF-AB in Kulturüberständen von rekombinanten BHK-Zellen mittels PDGF-AB-ELISA: (Eichkurven von Standards s. Fig. 6). Die dargestellten Proben stammten von BHK-Zellen, die mit folgenden Vektorkonstrukten transfiziert worden waren:

Probe: Nr.1: pSBC-A/B,

Nr.2: pSBC-B/A,

Nr.3: pSBC-2-PDGF-A +pSBC-2-PDGF-B,

Nr.4: pSBC-2-PDGF-A,

Nr.5: pSBC-2-PDGF-B,

Nr.6: pSBC-2-Kontrolle

Fig. 8) Analyse von gereinigtem rPDGF über SDS-PAGE. Die Proben wurden auf einem 13,5%igen Polyacrylamidgel in der Gegenwart von SDS aufgetrennt und anschließend mit Coomassieblau gefärbt.

5

1, 6, 11 = LMW (PHARMACIA) [14400, 20100, 30000, 43000, 67000, 94000 D]

2 = pSBC-B/A

3 = pSBC-2-PDGF-A + pSBC-2-PDGF-B

10 4 = pSBC-A/B

5 = pSBC-2-PDGF-A

7-10 = gleiche Auftragsreihenfolge wie 2-5, unter Zugabe von jeweils 10% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol (10 min, 95°C)

15

Die Analyse der gereinigten Sekretionsprodukte über SDS-PAGE korreliert mit den Ergebnissen aus der Analyse der Kulturüberstände (Tab. 2). Insbesondere an den unter reduzierenden Bedingungen auftretenden Banden der PDGF-Monomere kann man gut erkennen, daß Transfektionszellpools der Konstellation pSBC-2PDGF-A + pSBC-2-PDGF-B (Cotransfer) und pSBC-A/B (PDGF-A-Kette im ersten Cistron) überwiegend PDGF-AA-Homodimere sekretieren.

20

25

Das aus pSBC-B/A-Kulturüberständen isolierbare PDGF bandiert gegenüber dem als Referenz aufgetragenen PDGF-AA bei einem geringfügig niedrigeren Molekulargewicht. Unter reduzierenden Bedingungen lassen sich beide Monomere zu etwa gleichen Teilen nachweisen. Die oberen Banden korrespondieren mit den Monomer-Banden der PDGF-A-Kette. Für rekombinantes PDGF-AA aus BHK-Zellen wurde bereits gezeigt, daß dieses Material zu etwa gleichen Anteilen aus der vollständigen PDGF-A-Kette, sowie einer C-terminal verkürzten Spezies besteht (Eichner et al., 1989).

30



- 19 -

5 Die monomeren PDGF-A-Ketten bandieren bei einer  $M_r$  von etwa 17 KD. Darunter bandiert die PDGF-B-Kette ( $M_r$  16 KD), die bei dem aus pSBC-B/A-Überständen isolierten Material ebenfalls in einer verkürzten Form auftritt. Die Subspezies  
10 beider Ketten wurden gemeinsam durch Proteinsequenzanalyse analysiert und eindeutig als PDGF-A und PDGF-B identifiziert. Molekulargewichtsunterschiede für PDGF-B sind daher, genau wie bei PDGF-A, möglicherweise auf C-terminale Verkürzungen oder veränderte Glycosylierungsmuster zurückzuführen. PDGF aus Überständen von pSBC-B/A besteht demnach zu etwa gleichen Teilen aus PDGF-A und PDGF-B-Ketten.

15 Das als Referenz aufgetragene, ebenfalls in BHK-Zellen exprimierte PDGF-AA ist nicht glykosyliert (Eichner et al., 1989), während in CHO-Zellen exprimiertes PDGF einen Kohlenhydratanteil von etwa 7% enthält (Kolvenbach et al., 1991). Die PDGF-A-Monomere sowohl aus dem PDGF-AA-Homodimer als auch aus dem AB-Heterodimer stimmen in ihrem Laufverhalten in der SDS-PAGE gut überein.

## 2. Expression von PDGF-AB Heterodimer mit Hilfe des bicistronischen Vektorsystems

## 2.1 Herstellung der Basisvektoren pSBC-1 und pSBC-2 (Fig.1)

Für die Konstruktion des Vektors pSBC-1 wurde ein 627 bp MseI/BalI-Fragment aus dem Plasmid pGEM3-5' Polio (M) (Sarnow, 1989) als Matrize für eine PCR mit folgenden Primern verwendet:

5'-Poliol      5' TTT CTGCAG AAGCTT AAAACAGCTCTGGGG 3'

PstI HindIII

(SEQ ID Nr. 13)

3'-Polio2 5'TT GCGGCCGC AATCCAATTCGCTTTATG<sup>3'</sup>

Not I

(SEQ ID Nr. 14)

Das nach der Amplifikation erhaltene 652 bp Fragment wurde mit Pol I K behandelt, anschließend mit PstI gespalten und in den entsprechend präparierten Vektor pBEH (Artelt et al., 1988) insertiert.

Für die Konstruktion des Vektors pSBC-2 wurde das Plasmid pBEH mit Eco RI linearisiert und die folgenden Oligonukleotidsequenzen hybridisiert und insertiert:

E-N-E1    5' AATT GCGGCCGC G<sup>3</sup>'                      (SEQ ID Nr. 15)

E-N-E2    3'CGCCGGCG CTTAA5'                      (SEQ ID Nr. 16)

## 30 2.2 Rekonstitution der vollständigen PDGF-B-Vorläufersequenz

Das Plasmid pMVW-2 enthält die cDNA des humanen PDGF-B Gens, welches im 5'-translatierten Bereich der Vorläufersequenz unvollständig ist (Weich et al., 1986). Für die Rekonstitution des authentischen PDGF-B precursors wurde in den 5'-terminalen Bereich des Vorläufers durch einen C-T-Austausch

in Position 30 des codogenen Abschnittes des Klons pMVW-2 eine BclI-Schnittstelle eingeführt. Durch diesen Schritt geht letztlich nur ein kurzer Abschnitt des kodierenden Bereiches verloren und die lokal codierte Aminosäure (Asparaginsäure) bleibt dabei erhalten. Da die BclI-Schnittstelle in den meisten *E.coli*-Stämmen durch Methylierung resistent gegenüber enzymatischer Spaltung ist, muß das diese Schnittstelle enthaltene Fragment entweder in einen *dam*<sup>-</sup>-Stamm umkloniert, oder über einen PCR-Schritt amplifiziert werden. Der fehlende Bereich des Vorläufers wird dann als synthetisches SalI/BclI-Fragment [Oligomere PPDGFB1 und PPDGFB2 (SEQ ID Nr. 11 + 12)] eingesetzt.

Hierfür wurde zunächst das 914 bp BamHI/NcoI-Fragment aus pMVW-2 über einen synthetischen Adapter [Oligomere NCCLSA1 und NCCLSA2 (SEQ ID Nr. 8 + 9)] in den BamHI/SalI-gespaltenen Bakteriophagen M13mp19 (Pharmacia) insertiert. Dieses Konstrukt lieferte die notwendige Einzelstrang-DNA für den nachgeschalteten *in vitro* Mutageneseschritt, der mit Hilfe des Oligomer-directed *in vitro* mutagenesis system (Version 2) der Fa. Amersham, basierend auf der Methode von Eckstein et al. [Taylor J. W., Ott J. and Eckstein F. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 8764-8785; Nakamaye K. and Eckstein F. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 9679-9698; Sayers J. R., Schmidt W. and Eckstein F. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 791-802] durchgeführt wurde. Durch den synthetischen Primer [PDGGBCL (SEQ ID Nr. 10)] wird nach der Mutagenese ein Basenaustausch (C zu T) in Position 144 der unter SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz erreicht und dadurch im 5'-Bereich des PDGF-B precursors eine BclI-Schnittstelle eingeführt. Dieses Mutagenesederivat wurde als M13BCL1 bezeichnet (Fig. 2).

Ein 1100 bp Fragment aus M13BCL1 wurde über einen PCR-Schritt mit Hilfe der Primer M1317MER und M1324MER (SEQ ID Nr. 6 + 7) amplifiziert, anschließend einer BclI/HindIII-Restriktion unterworfen und das resultierende 770 bp Frag-

ment isoliert. Die synthetischen Oligomere PPDGFB1 und PPDGFB2 (SEQ ID Nr. 11 + 12) bilden den fehlenden 5'-Bereich des PDGF-B-Vorläufers bis zur BclI-Schnittstelle. Nach dem Annealing wurde dieses doppelsträngige Oligomer anschließend, zusammen mit dem 770 bp PDGF-B Fragment, in den mit einer SalI/HindIII Restriktion vorbereiteten Vektor pGEM-2 (Promega) ligiert (Fig. 3). Die authentische Sequenz von PDGF-B wurde durch vollständige Sequenzierung verifiziert.

### 10 2.3 Konstruktion der bicistronischen Expressionsvektoren pSBC-PDGF-A/B und pSBC-PDGF-B/A für die PDGF-A- und B-Kette (Fig. 4A und B)

Die vollständige codierende cDNA für den PDGF-B precursor (Ratner et al., 1985) liegt in dem Vektor pGEM2-PDGF-B vor, wie unter 1.2 beschrieben. Die vollständige cDNA-Sequenz der kurzen Variante der PDGF-A-Kette (Betsholtz et al., 1986) ist im Expressionsvektor pODA (Eichner et al., 1989) enthalten. Dieser Vektor wurde erhalten durch Klonierung des RsaI-Fragments aus pPGF-1 (Hoppe et al., 1987) in den SV-40 Expressionsvektor pBEH (Artelt et al., 1988).

Die kodierenden cDNA-Sequenzen der PDGF-A- und -B-Kette wurden unter Verwendung von EcoRI/HindIII Restriktionen in die monocistronischen Vektoren pSBC-1 und -2 insertiert (Abb. 4). Die Fusion beider Vektoren zu einer bicistronischen Expressionseinheit wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme XmnI/NotI durchgeführt.

### 30 2.4 Herstellung transformierter BHK-Zellen

Die Transfektion der mono- und bicistronischen Expressionsvektoren, die die codierenden Sequenzen der A- und B-Kette von PDGF tragen (vgl. Fig.1, 4A+B) wurde mit der Calciumphosphat-Präzipitationstechnik in BHK-Zellen durchgeführt (Wigler et al., 1979; Graham & van der Eb, 1973). Einen Tag

vor der Transfektion wurden  $2-3 \times 10^5$  BHK-Zellen/24 cm<sup>2</sup> in neue Kulturflaschen umgesetzt. Vier Stunden vor der Transfektion wurde ein Medienwechsel mit DME-Medium durchgeführt. 5 µg der o. g. Plasmid-DNA zusammen mit 0,5 µg der Selektionsplasmide pAG60 und pSVpac (Colbère-Garapin, 1981; Vara et al., 1986), welche für ein Neomycinresistenzgen bzw. für eine Puromycin-Resistenz kodieren, in 250 µl 250 mM CaCl<sub>2</sub> suspendiert. Die Lösung wurde langsam unter ständiger Verwirbelung durch steril eingeblasene Luft zu 250 µl 2 x HEPES-Puffer (280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,1) gegeben und das erhaltene Präzipitat dem Nährmedium zugesetzt. Zwei Tage nach der Transfektion wurde durch Medienwechsel von DME- auf Doppelselektionsmedium (5 µg/ml Puromycin; 500 µg/ml G418, Wirth et al., 1988) die Selektion auf stabil transfizierte Zellen begonnen und eine Population von PDGF sekretierenden Zellklonen erhalten. Ein repräsentatives Klongemisch dieser Zellen wurde bei der DSM am 11. 8. 1992 unter der Nummer DSM ACC2045 hinterlegt.

## 20 2.5 Northern Blot Analyse

25 Polyadenylierte RNA aus transformierten BHK-Zellen wurde nach Purchio et al., (1979) isoliert, über ein 1%iges Agarose-Formaldehydgel fraktioniert (Lehrach et al., 1977), auf eine Nylonmembran geblottet und mit [<sup>32</sup>P]-markierten PDGF-A- und -B-Ketten spezifischen Sonden hybridisiert (Fig. 5).

## 30 2.6 Gewinnung konditionierter Zellkulturüberstände

35 Die Transformation der BHK-Zellen erfolgte analog 2.4. Nach dem Auszählen der Kolonien wurden die Zellen abtrypsinisiert, in frischem Selektionsmedium aufgenommen und auf eine Zellzahl von  $10^5$  Zellen/ml eingestellt. Je 10 ml dieser Zellsuspension wurden in eine Flasche mit 65 cm<sup>2</sup> Bodenfläche überführt und für weitere 48 h kultiviert. Danach wurde das

- 24 -

Medium entfernt und durch 10 ml Produktionsmedium (DMEM, ohne Serum und Selektions-Antibiotika) ersetzt. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch serumhaltiges Selektionsmedium ersetzt. Die geernteten Überstände wurden bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zum Zeitpunkt der Ernte betrug die Zellzahl/Flasche  $0.8-1.2 \times 10^7$ .

## 2.7 Nachweis von PDGF in den Kulturüberständen mit Hilfe des Mitogentests

Die Messung der Stimulierung der DNA-Syntheserate von dichtearretierten Fibroblasten erlaubt eine Bestimmung der mitogenen Aktivität des PDGF. Eine Unterscheidung zwischen den Isoformen ist dabei nicht möglich.

Der Assay wurde gemäß Shipley et al. (1984) mit AKR-2B-Mausfibroblasten in 24-Well-Platten durchgeführt. Reines PDGF zeigt in dem Test eine halbmaximale Stimulierung bei einer Konzentration von etwa 5 ng/ml. Dieser Wert wurde benutzt, um Produktivitäten zu bestimmen. Die Ergebnisse aus dem Mitogentest sind in Fig. 7 den Werten aus dem PDGF-AB-ELISA gegenübergestellt.

## 2.8 Nachweis von PDGF-AB Heterodimer in den Kulturüberständen mit Hilfe eines spezifischen PDGF-AB ELISA's

Es wurde ein 'two-antibody sandwich assay' aufgebaut, der eine spezifische Quantifizierung von PDGF-AB neben PDGF-AA und -BB erlaubt.

Sandwich-Assay mit Hilfe eines monoklonalen und eines polyclonalen Anti-PDGF-Antikörpers:

Polystyrolplatten mit 96 Kavitäten (Fa. Dynatech, U-Platte, No. M124B) werden in folgender Reihenfolge beschichtet



- 25 -

(zwischen jedem Schritt jeweils 4 x Waschen mit PBS mit 0,05% Tween 20):

5 1) Schaf-Anti-Maus-IgG (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 1097 105), 3 µg/ml.

2) 1% BSA (Fa. E. Merck, Nr. 12018) in PBS, pH 7,5, 100 µl für 1 h bei R.T.

10 3) Maus-Hybridoma-Überstand von Klon 1B3 [erhalten durch Fusion von SP2/0-Myelomzellen mit Milzzellen von Mäusen, die mit rekomb. PDGF-AB (aus *E. coli* gemäß Hoppe et al. (1990) immunisiert worden waren], 2 µg/ml IgG2a/ml. Der monoklonale Antikörper bindet spezifisch an der B-Kette von PDGF-Dimeren.

15 4) PDGF-haltige Lösungen, verdünnt in PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween 20 (PBS+), 50 µl für 1 h bei R.T.

20 5) Polyklonales Kaninchen-Anti-PDGF-AA-IgG (Fa. Genzyme, No. ZP-214, bindet an der A-Kette von dimerem PDGF), 2 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T.

25 6) POD-markiertes Ziege-Anti-Kaninchen IgG (Fa. Pierce, No. 31460), 0,1 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T., Detektion mit dem Substrat Tetramethylbenzidin gemäß E.S. BOS et al. (J.Immunoassay 2 (1981), 187-204).

#### 2.8.1 Ergebnisse:

30

In der Abbildung 7 sind die Resultate von drei unterschiedlichen Analysen für PDGF aus Kulturüberständen rekombinanter BHK-Zellen dargestellt.

35

Der Mitogentest liefert einen brauchbaren Wert für die Gesamtmenge des in den Kulturüberständen vorhandenen

- 26 -

rPDGF, ohne zwischen den verschiedenen Isoformen (PDGF-AA, AB oder BB) differenzieren zu können.

Der spezifische Anteil an heterodimerem PDGF-AB kann mit ausreichend hoher Genauigkeit durch den PDGF-AB-spezifischen ELISA bestimmt werden. Aus der Differenz dieser Analyse zum Ergebnis des Mitogentests kann der prozentuale Anteil von PDGF-Homodimeren rechnerisch ermittelt werden (Tabelle 1).

Das Ergebnis des ELISA's zeigt, daß nur in Kulturüberständen von transfizierten Zelllinien des Typs pSBC-PDGF-B/A die meßbare biologische Aktivität im Mitogentest mit hohen PDGF-AB-Werten korreliert.

#### 2.9 Reinigung des sekretierten PDGF-AB

Für die Reinigung der Sekretionsprodukte aus 1,5 - 2,5 Litern konditionierter Kulturüberstände der unterschiedlichen Transfektions-Zellpools wurde ein für die Reinigung von rPDGF-AA aus Zellkulturüberständen entwickeltes Verfahren angewendet (Eichner et al., 1989). Das nach dem HPLC-Schritt hoch- oder teilgereinigte PDGF wurde auf einem Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) in der Gegenwart von SDS aufgetrennt und nach anschließender Coomassieblaufärbung analysiert (Fig. 8).

#### 2.10 Aminoterminal Sequenzierung von PDGF-Polypeptiden

Durch Proteinsequenzanalyse sollten beide PDGF-Ketten eindeutig identifiziert werden um auszuschließen, daß hier verkürzte, prozessierte Formen nur einer PDGF-Kette vorliegen (s. Fig. 8).

Die automatische Sequenzanalyse wurde am Modell 477A (Applied Biosystems) mit dem Zyklus BLOTT1 durchgeführt. Die

Analyse der Phenylthiohydantoin-Aminosäuren-Derivate erfolgte auf dem online gekoppelten 120A PTH-Analyser.

5 Die Disulfidbrücken der Probe werden mit Dithiothreitol reduziert und mit 4-Vinylpyridin alkyliert. Sie wird auf einem horizontalen SDS-Elektrophorese-Gel nach Schägger und von Jagow, modifiziert wie beschrieben (Westermeier et al. SD 092/89, Pharmacia LKB Biotechnologie) getrennt. Die Probe wird auf eine PVDF-Membran (Problot, Applied Biosystems) mit 10 einem diskontinuierlichen Puffersystem wie beschrieben (Westermeier et al. SDRE-072, Pharmacia LKB Biotechnologie) geblottet und mit Comassie Brilliant Blau R250 gefärbt. Die beiden Doppelbanden bei 17 und 16 KD werden ausgeschnitten und zusammen sequenziert.

15

Nach den Ergebnissen der Proteinbestimmung wurden 10 µg Probe analysiert. Es konnten die N-terminalen Aminosäuren der PDGF-A- und PDGF-B-Kette in gleicher Ausbeute nachgewiesen werden (Tabelle 2). Nebensequenzen wurden nicht detek- 20 tiert.

Tabelle 1

|                                    | pSBC-A/B | pSBC-B/A | pSBC-2-PDGF-A +<br>pSBC-2-PDGF-B | pSBC-2-PDGF-A | pSBC-2-PDGF-B | pSBC-Kontrolle |
|------------------------------------|----------|----------|----------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| PDGF [pg/ml]<br>(Mitogentest)      | 600      | 550      | 900                              | 1000          | 250           | 0              |
| PDGF-AB [pg/ml]<br>(PDGF-AB-ELISA) | 240      | 520      | 600                              | 30            | 10            | 10             |
| Anteil PDGF-AB                     | 40       | 95       | 56                               | 3             | 4             | 0              |

Tabelle 2

Aminosäuresequenzanalyse der PDGF-A- und PDGF-B-Kette

| Zyklus | PDGF-A |                    | PDGF-B |                    |
|--------|--------|--------------------|--------|--------------------|
|        | Code   | Ausbeute<br>(pmol) | Code   | Ausbeute<br>(pmol) |
| 1      | Ser    | 101,1*             | Ser    |                    |
| 2      | Ile    | 75,7               | Leu    | 89,7               |
| 3      | Glu    | 58,8               | Gly    | 82,0               |
| 4      | Glu    | 67,2               | Ser    | 42,9               |
| 5      | Ala    | 55,7               | Leu    | 70,2               |
| 6      | Val    | 61,0               | Thr    | 59,4               |
| 7      | Pro    | 45,9               | Ile    | 65,4               |
| 8      | Ala    | 104,6*             | Ala    |                    |
| 9      | Val    | 46,8               | Glu    | 49,9               |
| 10     | Cys    | 40,5               | Pro    | 31,8               |
| 11     | Lys    | 24,1               | Ala    | 34,6               |
| 12     | Thr    | 23,5               | Met    | 16,5               |
| 13     | Arg    | 30,3               | Ile    | 25,2               |
| 14     | Thr    | 24,7               | Ala    | 29,2               |
| 15     | Val    | 17,5               | Glu    | 28,6               |
| 16     | Ile    | 27,5               | Cys    | 23,2               |
| 17     | Tyr    | 16,4               | Lys    | 11,2               |
| 18     | Glu    | 20,9               | Thr    | 13,4               |
| 19     | Ile    | 24,8               | Arg    | 20,9               |
| 20     | Pro    | 17,1               | Thr    | 16,9               |
| 21     | Arg    | 29,0               | Glu    | 16,7               |
| 22     |        |                    | Val    | 19,8               |
| 23     | Gln    | 8,1                | Phe    | 10,2               |

\* Ausbeute aus beiden Ketten

**Abkürzungen:**

|       |  |
|-------|--|
| BHK   | - Hamsterzelllinie (Baby Hamster Kidney)     |
| bp    | - Basenpaar(e)                               |
| CHO   | - Hamsterzelllinie (Chinese Hamster Ovary)   |
| BSA   | - Rinderserumalbumin                         |
| D     | - Dalton                                     |
| DMEM  | - Dulbecco's Modified Eagle Medium           |
| ELISA | - enzyme-linked immunosorbent assay          |
| HEPES | - 4-(2-Hydroxyl)-1-piperazinethansulfonsäure |
| HPLC  | - Hochdruckflüssigkeitschromatographie       |
| IgG   | - Immunglobulin der Klasse G                 |
| IRES  | - internal ribosomal entry site              |
| nt    | - Nukleotid(e)                               |
| PAGE  | - Polyacrylamid-Gelelektrophorese            |
| PBS   | - phosphatgepufferte Kochsalzlösung          |
| PCR   | - Polymerase Kettenreaktion                  |
| PDGF  | - Wachstumsfaktor aus Thrombozyten           |
| POD   | - Peroxidase                                 |
| PVDF  | - Polyvinylidenfluorid                       |
| SDS   | - Natriumdodecylsulfat                       |
| UTR   | - nicht translatierte Region                 |



## LITERATUR

- Adam M. A., Ramesh N., Miller A. D., and Osborne W. R. A. (1991) J. Virol. 65, 4985-4990.
- Artelt P., Morelle C., Ausmeier M., Fitzek M., and Hauser H. (1988) Gene 68, 213-219.
- Beckmann M. P., Betsholtz C., Heldin C.-H., Westermark B., Di Marco E., Di Fiore P. P., Robbins K. C., and Aaronson S. A. (1988) Science 241, 1344-1349.
- Betsholtz C., Johnsson A., Heldin C.-H., Westermark B., Lind P., Urdea M. S., Eddy R., Shows T. B., Philpott K., Mellor A. L., Knott T. J., and Scott J. (1986) Nature 320, 695-699.
- Block L. H., Emmons L. R., Vogt E., Sachinidis A., Vetter W., and Hoppe J. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2388-2392.
- Boel E., Berkner K. L., Nexoe B. A., and Schwartz T. W. (1987) FEBS Lett. 219, 181-188.
- Bywater M., Rorsman F., Bongcam-Rudloff E., Mark G., Hammacher A., Heldin C.-H., Westermark B., and Betsholtz C. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 2753-2762.
- Colbère-Garapin F., Horodniceanu F., Kourilsky P., and Garapin A. C. (1981) J. Mol. Biol. 150, 1-14.
- Eichner W., Jäger V., Herbst D., Hauser H. and Hoppe J. (1989) Eur. J. Biochem. 185, 135-140.
- Falcone D., and Andrews D.W. (1991) Mol. Cell. Biol. 11 (5), 2656-2664.
- Ghattas I. R., Sanes J. R., and Majors J. E. (1991) Mol. Cell. Biol. 22, 5848-5859.
- Graham F., and van der Eb L. (1973) Virology 52, 456-487.
- Hambidge S. J., and Sarnow P. (1991) J. Virol. 65, 6312-6315.
- Hammacher A., Hellmann U., Johnsson A., Östman A., Gunnarsson K., Westermark B., Wasteson Å., and Heldin C.-H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16493-16499.
- Hart C. E., Forstrom J. W., Kelly J. D., Seifert R. A., Smith R. A., Ross R., Murray M. J., and Bowen-Pope D. F. (1988) Science 240, 1529-1531.
- Hart C. E., Bailey M., Curtis D. A., Osborn S., Raines E., Ross R., and Forstrom J. W. (1990) Biochemistry 29, 166-172.

- Heldin C.-H., Johnsson A., Wennergren S., Wernstedt C., Betsholtz C., and Westermark B. (1986) *Nature* 319, 511-514.
- Heldin C.-H., Bäckström G., Östman A., Hammacher A., Rönnstrand L., Rubin K., Nister M., and Westermark B. (1988) *EMBO J.* 7, 1387-1393.
- Hoppe J., Schumacher L., Eichner W. and Weich H.A. (1987), *FEBS Lett.* 223, 243-246.
- Hoppe J., Weich H. A., and Eichner W. (1989) *Biochemistry* 28, 2956-2960.
- Hoppe J., Weich H. A., and Eichner W., and Tatje D. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 207-214.
- Hosang M., Rouge M., Wipf B., Eggiman B., Kaufmann F., and Hunziker W. (1989) *J. Cell. Physiol.* 149, 558-564.
- Jackson R. J., Howell M. T., and Kaminski A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 477-483.
- Jang S. K., Kräusslich H., Nicklin M. J. H., Duke G. M., Palmenberg A. C., and Wimmer E. (1988) *J. Virol.* 62, 2636.
- Jang S. K., Davies M. V., Kaufmann R. J., and Wimmer E. (1989) *J. Virol.* 63 (4), 1651-1660.
- Jang S. K., and Wimmer E. (1990) *Genes Dev.* 4, 1560-1572.
- Johnsson A., Heldin C.-H., Wasteson A., Westermark B., Deuel T. F., Huang J. S., Seeburg P. H., Gray A., Ullrich A., Scrase G., Stroobant P., Waterfield M. D. (1984) *EMBO J.* 136, 921-928.
- Kaufman R. J., Murtha P., and Davies M. V. (1987) *EMBO J.* 6, 187-193.
- Kaufman R. J., Davies M. V. Wasley L. C., and Michnick D. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490.
- Kelly J. D., Raines E. W., Ross R., and Murray M. J. (1985) *EMBO J.* 4, 3399-3405.
- Kolvenbach C. G., Langley K. E., Strickland T. W., Kenney W. C., and Arakawa T. (1991) *J. Biochem. Biophys. Meth.* 23, 295-300.
- Kozak M. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7 (10), 3438-3445.
- Kozak M. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 5134-5142.
- Laemmli U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
- Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M., and Boedtker H. (1977) *Biochemistry* 16, 4743-4751.

- Macejak D. G., and Sarnow P. (1991) *Nature* (London) 353, 90-94.
- Matoskova B., Rorsman F., Svensson V. and Betsholtz C. (1989), *Mol. Cell. Biol.* 9, 3148-3150.
- Meerovitch K., Pelletier J., and Sonenberg N. (1989) *Genes Dev.* 3, 1026-1034.
- Nister M., Hammacher A., Mellström K., Siegbahn A., Rönnerstrang L., Westermark B., and Heldin C.-H. (1988); *Cell* 52, 791-799.
- Östman A., Rall L., Hammacher A., Wormstead M. A., Coit D., Valenzuela P., Betsholtz C., Westermark B., and Heldin C.-H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16202-16208.
- Pelletier J., and Sonenberg N. (1988) *Nature* 334, 320.
- Purchio A. F. and Fareed G. C. (1979) *J. Virol.* 29, 763-769.
- Ratner L., Josephs S. F., Jarrett R., Reitz M. S. and Wong-Staal F. (1985), *Nucl. Acids Res.* 13, 5007-5018.
- Reilly C. F. and Broski J. B. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 1047-1054.
- Sachinidis A., Locher R., Vetter W., Tatje D., and Hoppe J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10238-10243.
- Sachinidis A., Locher R., Hoppe J., and Vetter W. (1990) *FEBS Lett.* 275, 95-98.
- Sarnow P. (1989) *J. Virol.* 63, 467-470.
- Shipley G. D., Childes C. B., Volkenant M. E. and Moses H. L. (1984) *Cancer Res.* 44, 710-716.
- Siegbahn A., Hammacher A., Westermark B., and Heldin C.-H. (1990) *J. Clin. Invest.* 85, 916-920.
- Simoes E. A. F., and Sarnow P. (1991) *J. Virol.* 65, 913-921.
- Stroobant P., and Waterfield M. D. (1984) *EMBO J.* 3, 2963-2967.
- Vara J., Portela A., Oritin J. and Jimenez A. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 4617-4624.
- Weich H. A., Sebald W., Schairer H. U., and Hoppe J. (1986), *FEBS Lett.* 198, 344-348.
- Wigler M., Sweet R., Sim G. K., Wold B., Pellicer A., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., and Axel R. (1979) *Cell* 16, 777-785.
- Wirth M., Bode J., Zettlmeißl G., and Hauser H. (1988) *Gene* 73, 419-426.

- 34 -

Wirth M., Schumacher L., and Hauser H. (1991) In Modern Approaches to Animal Cell Technology, Griffiths B., Spier R., and Meigner R., eds. Butterworths), pp. 338-343.

Wise R. J., Orkin S. H. and Collins T. (1989) Nucl. Acids Res. 17, 6591-6601.

Wood C. R., Morris G. E., Alderman E. M., Fouser L., and Kaufman R. J. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8006-8010.

Young R. M., Mendoza A. E., Collins T. and Orkin S. H. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 6051-6054.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Beiersdorf AG  
(B) STRASSE: Unnastr. 48  
(C) ORT: Hamburg  
(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 20245

(A) NAME: GBF - Gesellschaft fuer Biotechnologische  
Forschung mbH  
(B) STRASSE: Mascheroder Weg 1  
(C) ORT: Braunschweig  
(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 38124

(ii) ANMELDETITEL: Herstellung von heterodimerem PDGF-AB mit  
Hilfe eines bicistronischen Vektorsystems in Saeugerzellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 16

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 748 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: pODA (Eichner et al., 1989)

## (ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 95..682  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-A Vorlaeufersequenz  
(kurze Spliceform)"  
/note= "humanes PDGF-A Gen (kurze Spliceform, [2])  
aus pODA, flankiert von 5'-EcoRI und 3'-HindIII  
Restriktionsschnittstellen"  
/citation= ([2])

## (ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide  
(B) LAGE: 353..682  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-A Kette"

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSGENERATION:

(A) AUTOREN: Eichner, W.

Jaeger, V.

Herbst, D.

Hauser, H.

Hoppe, J.

(C) ZEITSCHRIFT: Eur. J. Biochem.

(D) BAND: 185

(F) SEITEN: 135-140

(G) DATUM: 1989

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSGENERATION:

(A) AUTOREN: Hoppe, J.

Schumacher, L.

Eichner, W.

Weich, H. A.

(C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.

(D) BAND: 223

(F) SEITEN: 243-246

(G) DATUM: 1987

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

|  |     |
|--|-----|
| GAATTCCCAC TGAATTTTCGC CGCCACAGGA GACCGGCTGG AGCGCCCGCC CCGCGCCTCG | 60  |
| CCTCTCCTCC GAGCAGCCAG CGCCTCGGGA CGCG ATG AGG ACC TTG GCT TGC      | 112 |
| Met Arg Thr Leu Ala Cys  |     |
| -86 -85  |     |
| CTG CTG CTC CTC GGC TGC GGA TAC CTC GCC CAT GTT CTG GCC GAG GAA    | 160 |
| Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala Glu Glu    |     |
| -80 -75 -70 -65  |     |
| GCC GAG ATC CCC CGC GAG GTG ATC GAG AGG CTG GCC CGC AGT CAG ATC    | 208 |
| Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg Leu Ala Arg Ser Gln Ile    |     |
| -60 -55 -50  |     |
| CAC AGC ATC CGG GAC CTC CAG CGA CTC CTG GAG ATA GAC TCC GTA GGG    | 256 |
| His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser Val Gly    |     |
| -45 -40 -35  |     |
| AGT GAG GAT TCT TTG GAC ACC AGC CTG AGA GCT CAC GGG GTC CAC GCC    | 304 |
| Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg Ala His Gly Val His Ala    |     |
| -30 -25 -20  |     |
| ACT AAG CAT GTG CCC GAG AAG CGG CCC CTG CCC ATT CGG AGG AAG AGA    | 352 |
| Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu Pro Ile Arg Arg Lys Arg    |     |
| -15 -10 -5   |     |
| AGC ATC GAG GAA GCT GTC CCC GCT GTC TGC AAG ACC AGG ACG GTC ATT    | 400 |
| Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val Ile    |     |
| 1 5 10 15  |     |
| TAC GAG ATT CCT CGG AGT CAG GTC GAC CCC ACG TCC GCC AAC TTC CTG    | 448 |
| Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu    |     |
| 20 25 30   |     |
| ATC TGG CCC CCG TGC GTG GAG GTG AAA CGC TGC ACC GGC TGC TGC AAC    | 496 |
| Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn    |     |
| 35 40 45   |     |
| ACG AGC AGT GTC AAG TGC CAG CCC TCC CGC GTC CAC CAC CGC AGC GTC    | 544 |
| Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val    |     |
| 50 55 60   |     |



- 37 -

|   |            |
|---|------------|
| AAG GTG GCC AAG GTG GAA TAC GTC AGG AAG AAG CCA AAA TTA AAA GAA<br>Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu<br>65 70 75 80 | 592        |
| GTC CAG GTG AGG TTA GAG GAG CAT TTG GAG TGC GCC TGC GCG ACC ACA<br>Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala Thr Thr<br>85 90 95    | 640        |
| AGC CTG AAT CCG GAT TAT CGG GAA GAG GAC ACG GAT GTG AGG<br>Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val Arg<br>100 105 110                 | 682        |
| TGAGGATGAG CCGCAGCCCT TTCCTGGGAC ATGGATGTGG GGATCCGTCG ACCTGCAGCC<br>AAGCTT   | 742<br>748 |

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 196 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

|  |
|--|
| Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala<br>-86 -85 -80 -75 |
| His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg<br>-70 -65 -60 -55 |
| Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu<br>-50 -45 -40     |
| Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg<br>-35 -30 -25     |
| Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu<br>-20 -15 -10     |
| Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys<br>-5 1 5 10       |
| Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro<br>15 20 25        |
| Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg<br>30 35 40        |
| Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg<br>45 50 55        |
| Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys<br>60 65 70        |
| Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu<br>75 80 85 90     |

- 38 -

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp  
                                   95                                  100                                  105  
 Thr Asp Val Arg  
                                   110                                  115

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 868 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pmvW-2 (Weich et al., 1986)

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 40..762
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-B  
 Vorläufersequenz"  
 /note= "humanes PDGF-B Gen aus pGEM2-PDGF-B,  
 flankiert von 5'-EcoRI und 3'-HindIII  
 Restriktionsschnittstellen"

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide
- (B) LÄNGE: 283..609
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-B Kette"

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSMITTELMATERIAL:

- (A) AUTOREN: Weich, H. A.  
 Sebald, W.  
 Schairer, H. U.  
 Hoppe, U.
- (C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.
- (D) BAND: 198
- (F) SEITEN: 344-348
- (G) DATUM: 1986

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

|   |     |
|---|-----|
| GAATTCGAGC TCGCCCGGGG ATCCTCTAGA GTCGACACC ATG AAT CGC TGC TGG  | 54  |
| Met Asn Arg Cys Trp   |     |
| -81 -80   |     |
| GCG CTC TTC CTG TCT CTC TGC TGC TAC CTG CGT CTG GTC AGC GCC GAG | 102 |
| Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg Leu Val Ser Ala Glu |     |
| -75 -70 -65   |     |
| GGG GAC CCC ATT CCC GAG GAG CTT TAT GAG ATG CTG AGT GAT CAC TCG | 150 |
| Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp His Ser |     |
| -60 -55 -50 -45   |     |

- 39 -

|  |     |
|--|-----|
| ATC CGC TCC TTT GAT GAT CTC CAA CGC CTG CTG CAC GGA GAC CCC GGA<br>Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu His Gly Asp Pro Gly<br>-40 -35 -30  | 198 |
| GAG GAA GAT GGG GCC GAG TTG GAC CTG AAC ATG ACC CGC TCC CAC TCT<br>Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr Arg Ser His Ser<br>-25 -20 -15  | 246 |
| GGA GGC GAG CTG GAG AGC TTG GCT CGT GGA AGA AGG AGC CTG GGT TCC<br>Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg Arg Ser Leu Gly Ser<br>-10 -5 1     | 294 |
| CTG ACC ATT GCT GAG CCG GCC ATG ATC GCC GAG TGC AAG ACG CGC ACC<br>Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr<br>5 10 15 20   | 342 |
| GAG GTG TTC GAG ATC TCC CGG CGC CTC ATA GAC CGC ACC AAC GCC AAC<br>Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn Ala Asn<br>25 30 35     | 390 |
| TTC CTG GTG TGG CCG CCC TGT GTG GAG GTG CAG CGC TGC TCC GGC TGC<br>Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys<br>40 45 50     | 438 |
| TGC AAC AAC CGC AAC GTG CAG TGC CGC CCC ACC CAG GTG CAG CTG CGA<br>Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln Leu Arg<br>55 60 65     | 486 |
| CCT GTC CAG GTG AGA AAG ATC GAG ATT GTG CGG AAG AAG CCA ATC TTT<br>Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile Phe<br>70 75 80     | 534 |
| AAG AAG GCC ACG GTG ACG CTG GAA GAC CAC CTG GCA TGC AAG TGT GAG<br>Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys Cys Glu<br>85 90 95 100 | 582 |
| ACA GTG GCA GCT GCA CGG CCT GTG ACC CGA AGC CCG GGG GGT TCC CAG<br>Thr Val Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser Pro Gly Gly Ser Gln<br>105 110 115      | 630 |
| GAG CAG CGA GCC AAA ACG CCC CAA ACT CGG GTG ACC ATT CGG ACG GTG<br>Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val Thr Ile Arg Thr Val<br>120 125 130  | 678 |
| CGA GTC CGC CGG CCC CCC AAG GGC AAG CAC CGG AAA TTC AAG CAC ACG<br>Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg Lys Phe Lys His Thr<br>135 140 145  | 726 |
| CAT GAC AAG ACG GCA CTG AAG GAG ACC CTT GGA GCC TAGGGGCATC<br>His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly Ala<br>150 155 160                       | 772 |
| GGCAGGAGAG TGTGTGGGCA GGGTTATTTA ATATGGTATT TGCTGTATTG CCCCCATGGC<br>CCAATCGATC CCGTCGACCT GCAGGCATGC AAGCTT                                       | 832 |
|  | 868 |

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 241 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear-

(11) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

```
Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg  
-81 -80                               -75                             -70
```

Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met  
-65 -60 -55 -50

Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu  
 -45 -40 -35

His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met  
 -30 -25 -20

Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg  
 -15 -10 -5

Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu  
 1 5 10 15

Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp  
 20 25 30

Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln  
 35 40 45

Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr  
 50 55 60

Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg  
 65 70 75

Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu  
 80 85 90 95

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser  
 100 105 110

Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val  
 115 120 125

Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg  
 130 135 140

Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly  
 145 150 155

Ala  
160

- 41 -

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

## (1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 628 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Poliovirus Typ 1 (Mahoney strain)

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pGEM3-5'Polio (M) (4708 bp), (Sarnow, 1989)

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..628
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "abgebildet sind die ersten 628 nt der 5' nicht-translatierten Region des Poliovirus Typ 1 (Mahoney)"

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 610
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "nicht-authentische Sequenz auf Grund einer Basenpaarsubstitution von C nach G an der Position 610"

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSGEINFORMATION:

- (A) AUTOREN: Sarnow, P.
- (C) ZEITSCHRIFT: J. Virol.
- (D) BAND: 63
- (F) SEITEN: 467-470
- (G) DATUM: 1989

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

|   |     |
|---|-----|
| TTAAACAGC TCTGGGGTTG TACCCACCCC AGAGGCCAC GTGGCGGCTA GTACTCCGGT   | 60  |
| ATTGCGGTAC CTTGTACGC CTGTTTATA CTCCCTTCCC GTAACCTAGA CGCACAAAAC   | 120 |
| CAAGTTCAAT AGAAGGGGGT ACAAACCAGT ACCACCACGA ACAAGCACTT CTGTTTCCCC | 180 |
| GGTGATGTCG TATAGACTGC TTGCGTGGTT GAAAGCGACG GATCCGTTAT CCGCTTATGT | 240 |
| ACTTCGAGAA GCCCAGTACC ACCTCGGAAT CTTGATGCG TTGCGCTCAG CACTCAACCC  | 300 |
| CAGAGTGTAG CTTAGGCTGA TGAGTCTGGA CATCCCTCAC CGGTGACGGT GGTCCAGGCT | 360 |
| GCGTTGGCGG CCTACCTATG GCTAACGCCA TGGGACGCTA GTTGTGAACA AGGTGTGAAG | 420 |
| AGCCTATTGA GCTACATAAG AATCCTCCGG CCCCTGAATG CGGCTAATCC CAACCTCGGA | 480 |
| GCAGGTGGTC ACAAACCAGT GATTGGCCTG TCGTAACGCG CAAGTCCGTG GCGGAACCGA | 540 |
| CTACTTTGGG TGTCCGTGTT TCCTTTTATT TTATTGTGGC TGCTTATGGT GACAATCACA | 600 |
| GATTGTTATG ATAAAGCGAA TTGGATTG                                    | 628 |

- 42 -

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..17
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M1317MER  
/note= "synthetische DNA; M13 Sequenzierprimer  
(New England Biolabs GmbH), eingesetzt fuer PCR"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..24
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M1324MER  
/note= "synthetische DNA; M13 reverser  
Sequenzierprimer (New England Biolabs GmbH),  
eingesetzt fuer PCR"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

AGCGGATAAC AATTTCACAC AGGA

24

- 43 -

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -  
(B) LÄGE: 1..19  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= NCCLSA1  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur  
Umklonierung des verkürzten PDGF-B Vorläufers  
aus pMVW-2 in den Bakteriophagen M13mpl9"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CATGGCCCAA TCGATCCCG

19

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -  
(B) LÄGE: 1..19  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= NCCLSA2  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur  
Umklonierung des verkürzten PDGF-B Vorläufers  
aus pMVW-2 in den Bakteriophagen M13mpl9"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TCGACGGGAT CGATTGGGC

19



- 44 -

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..37
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PDGBBCL  
/note= "synthetische DNA; Mutageneseprimer zur  
Einführung einer BclI-Schnittstelle in den  
5'-Bereich des PDGF-B Vorläufers"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GCTTTATGAG ATGCTGAGTG ATCACTCGAT CCGCTCC

37

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 110 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄNGE: 1..110
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PPDGFB1  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur  
Rekonstitution der maturen PDGF-B  
Vorläufersequenz"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

TCGACACCAT GAATCGCTGC TGGGCGCTCT TCCTGTCTCT CTGCTGCTAC CTGCGTCTGG

60

TCAGCGCCGA GGGGGACCCC ATTCCCGAGG AGCTTTATGA GATGCTGAGT

110

- 45 -

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 110 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄGE: 1..110
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PPDGFB2  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur  
Rekonstitution der maturen PDGF-B  
Vorläufersequenz"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GATCACTCAG CATCTCATAA AGCTCCTCGG GAATGGGGTC CCCCTCGGCG CTGACCAGAC 60  
GCAGGTAGCA GCAGAGAGAC AGGAAGAGCG CCCAGCAGCG ATTCATGGTG 110

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LÄGE: 1..30
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= 5'-POLIO1  
/note= "synthetische DNA; synthetischer  
PCR-Primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TTTCTGCAGA AGCTTAAAC AGCTCTGGGG

30

- 46 -

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -  
(B) LÄNGE: 1..28  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= 3'-POLI02  
/note= "synthetische DNA; synthetischer  
PCR-Primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

TTGCGGCCGC AATCCAATTC GCTTTATC

28

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 13 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -  
(B) LÄNGE: 1..13  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= E-N-E1  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

AATTGCGGCC GCG

13

- 47 -

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 13 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMALE:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: -  
 (B) LAGE: 1..13  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= E-N-E2  
 /note= "synthetische DNA; synthetischer Linker"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

AATTCGCGGC CGC

- 48 -

## Patentansprüche

1. Bicistronische Expressionseinheit zur rekombinanten Herstellung von heterodimerem PDGF-AB in Säugerzellen als Wirtszellen, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel

$$p - 5'UTR - C_1 - IRES - C_2 - 3'UTR - polyA,$$

in der

p ein transkriptionaler Promotor ist,

5'UTR eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

C<sub>1</sub> ein Cistron ist, welches ein für die B-Kette von PDGF, ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthält,

IRES eine Nukleotidsequenz viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs ist, die in der Stufe der Translation für die interne Initiation verantwortlich ist,

C<sub>2</sub> ein Cistron ist, welches ein für die A-Kette von PDGF oder ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthält,

3'UTR eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

und polyA ein Polyadenylierungssignal ist,

wobei C<sub>1</sub>, IRES und C<sub>2</sub> operativ miteinander verknüpft sind.

- 49 -

2. Expressionseinheit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß C<sub>1</sub> die vollständige PDGF-B Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 3), deren allelische Varianten oder Fragmente derselben enthält, welche für eine biologisch wirksame PDGF-B Kette kodiert.
3. Expressionseinheit nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß C<sub>1</sub> das v-sis-Gen aus Simian Sarcoma Virus oder die Basenpaare 283 bis 609 gemäß SEQ ID Nr. 3 enthält.
4. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß C<sub>2</sub> die PDGF-A<sub>K</sub>- (SEQ ID Nr. 1) oder die PDGF-A<sub>L</sub> Vorläufer-Sequenz enthält.
5. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß IRES die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 5 ist.
6. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß IRES die 5'UTR des Enzephalomyocarditis Virus (EMV), des "Theilers murine encephalomyelitis virus" (TMEV), des "foot and mouth disease virus" (FMDV), des "bovine enterovirus" (BEV), des "coxsackie B virus" (CBV), des "human rhinovirus" (HRV) oder die "human immunoglobulin heavy chain binding protein" (BIP) 5'UTR, die Drosophila Antennapediae 5'UTR, die Drosophila Ultrabithorax 5'UTR oder genetische Hybride oder Fragmente aus den oben angeführten Sequenzen ist.
7. Rekombinanter DNA-Vektor, welcher die Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6, operativ verknüpft mit Expressionskontrollsequenzen, enthält.
8. Wirtszelle, welche eine Säugerzelle transformiert mit dem Vektor gemäß Anspruch 7 ist.

- 50 -

9. Wirtszelle nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine CHO- oder BHK-Zelle ist.
10. Wirtszelle nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine BHK-Zelle ist und von dem Klon 91-24-4D mit der Hinterlegungs-Nr. DSM ACC2045 abstammt.
11. Verfahren zur Herstellung von heterodimerem rPDGF-AB, dadurch gekennzeichnet, daß man Säugerzellen als Wirtszellen, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6 operativ insertiert enthalten, in einem geeigneten Medium kultiviert und das so erzeugte rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium abtrennt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle eine Zelle nach den Ansprüchen 9 bis 11 ist.
13. Heterodimeres rPDGF-AB, im wesentlichen frei von homodimeren Begleitprodukten, erhältlich durch Kultivieren von Säugerzellen als Wirtszellen, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6 operativ verknüpft enthalten, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.
14. Heterodimeres rPDGF-AB, im wesentlichen frei von homodimeren Begleitprodukten, erhältlich durch Kultivieren von BHK- oder CHO-Zellen als Wirtszellen, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6 operativ verknüpft enthalten, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.



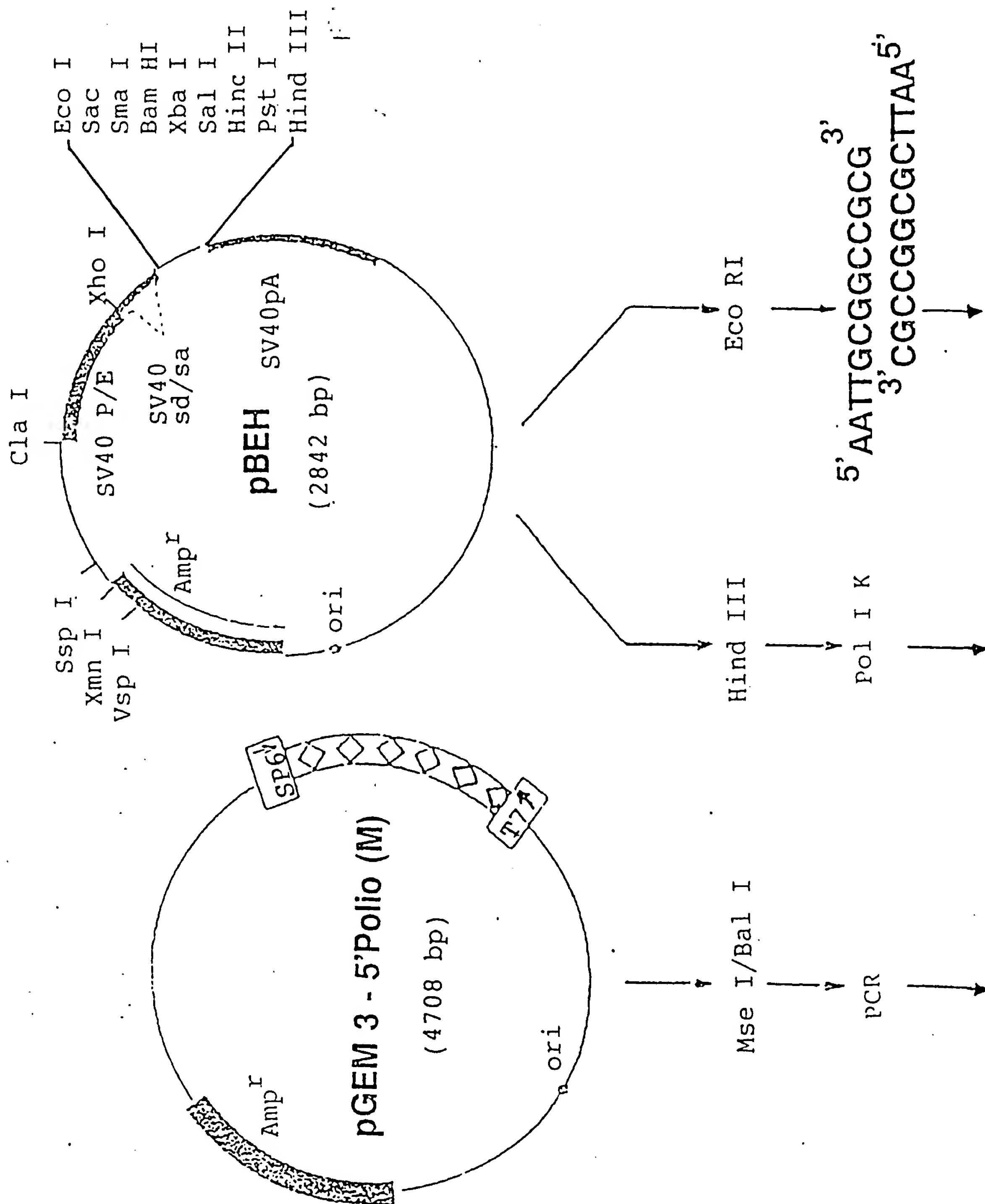
- 51 -

15. Heterodimeres, im wesentlichen von homodimeren Begleitprodukten freies PDGF-AB, erhältlich durch Kultivieren von Wirtszellen gemäß Anspruch 10, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6 operativ verknüpft enthalten, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.
16. Pharmazeutisches und/oder kosmetisches Präparat, enthaltend rPDGF-AB hergestellt nach dem Verfahren gemäß den Ansprüchen 11 oder 12 zusammen mit pharmazeutisch und/oder kosmetisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen.
17. Pharmazeutisches und/oder kosmetisches Präparat, enthaltend rPDGF-AB nach den Ansprüchen 13 bis 15 zusammen mit pharmazeutisch und/oder kosmetisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen.
18. Pharmazeutisches Präparat nach den Ansprüchen 16 oder 17 in Form einer Salbe, eines Gels, eines Sprays, eines Pflasters, eines Wundverbandes oder einer Wundauflage.

1/13

Figur 1a

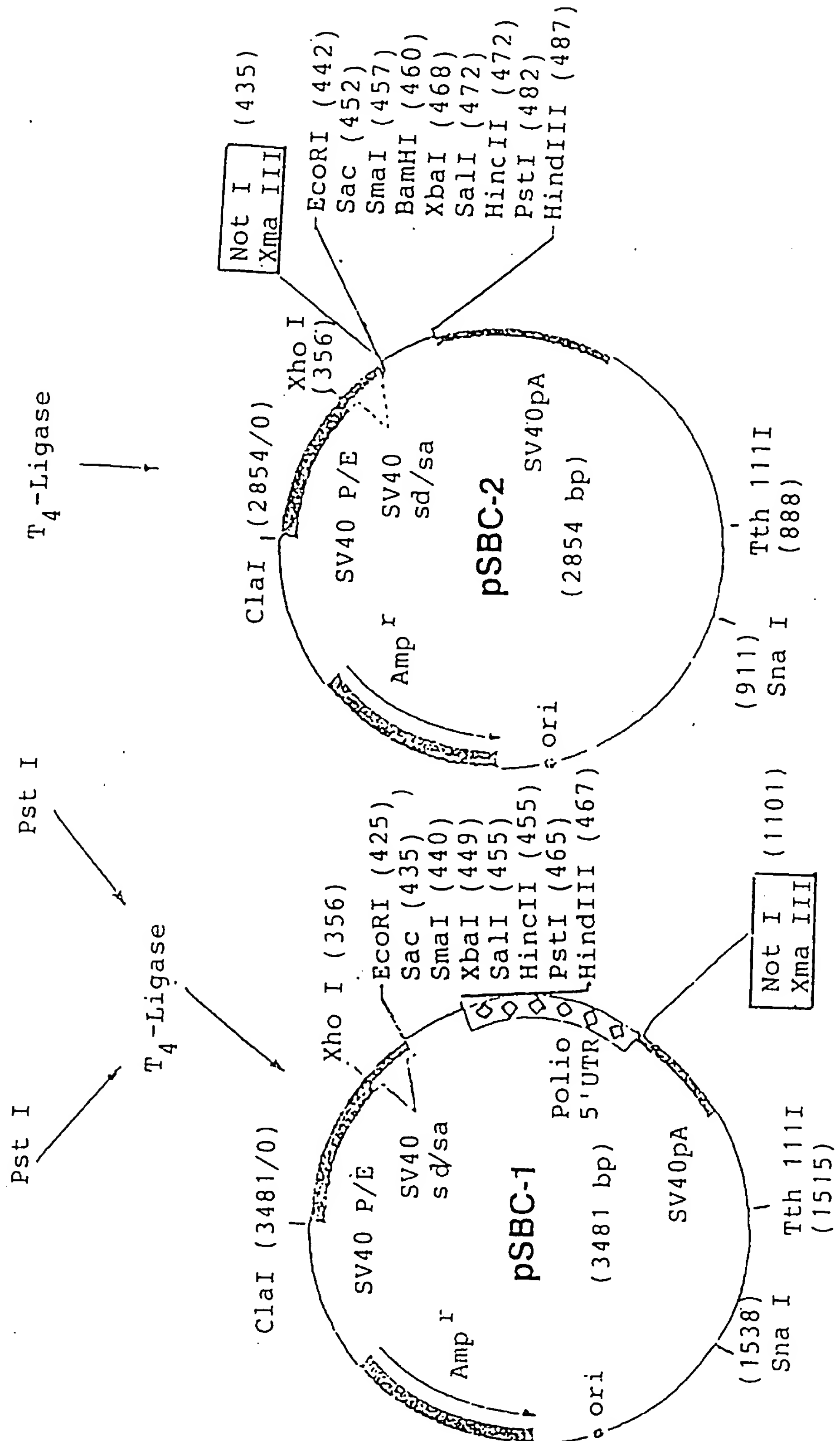
(Fortsetzung Figur 1b) →



ERSATZBLATT

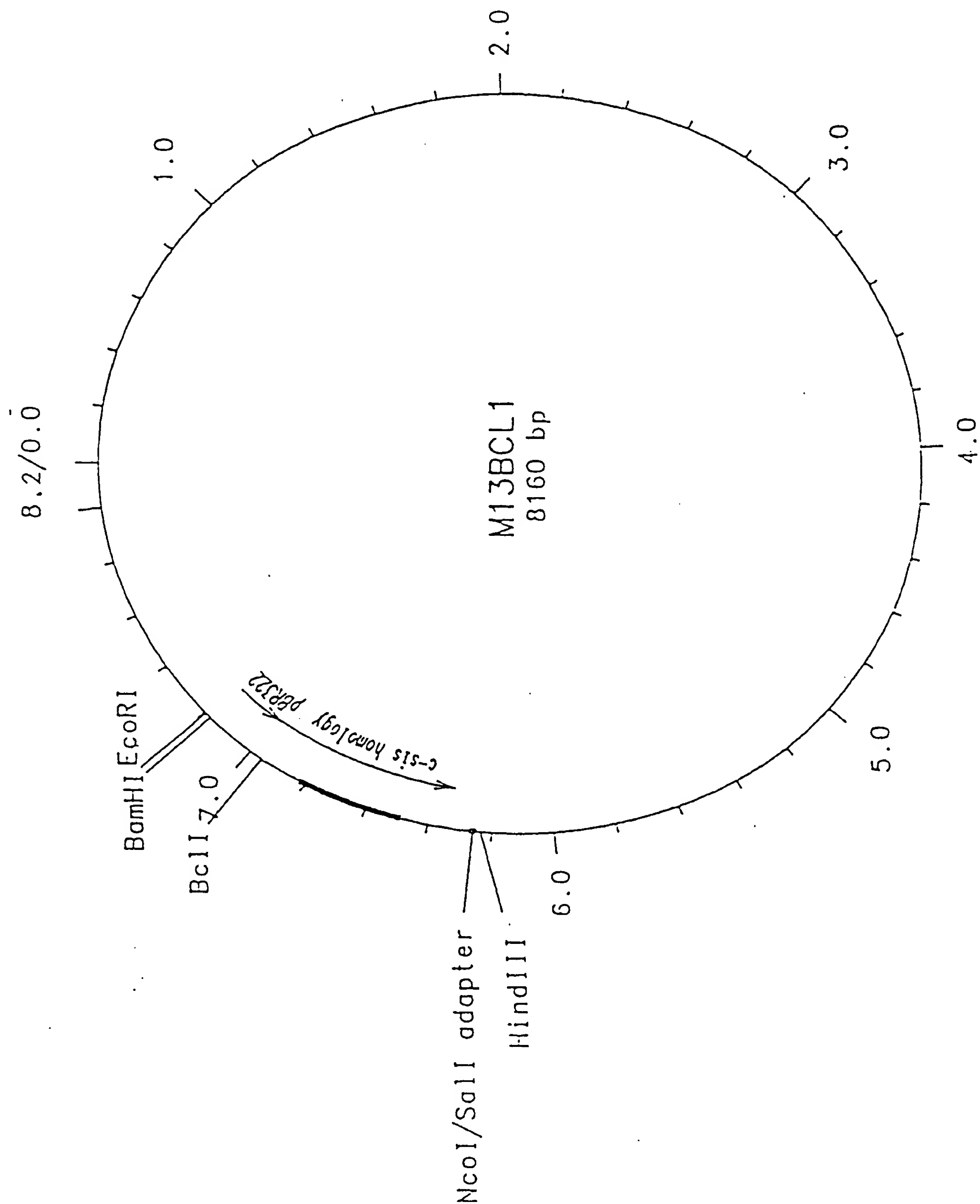
2/13

Figur 1b



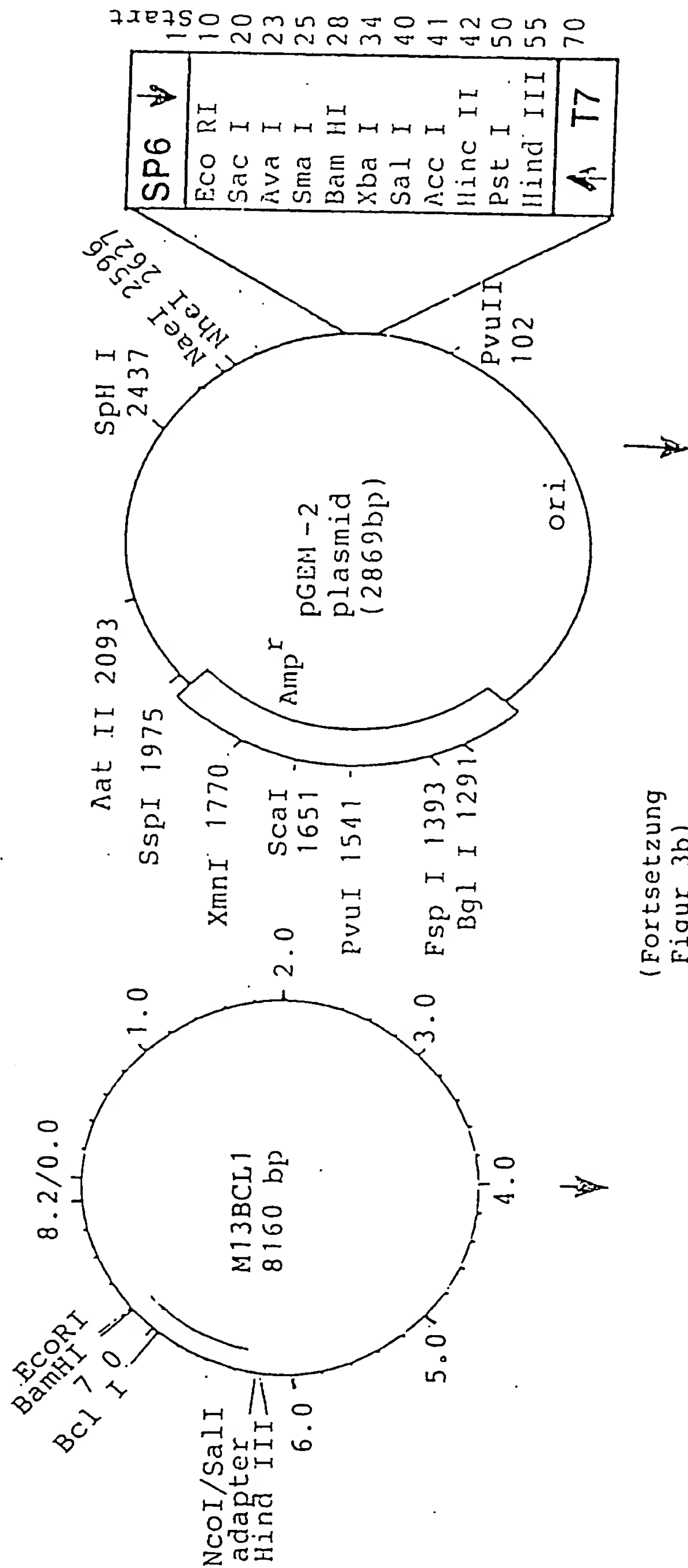
3/13

Figur 2



ERSATZBLATT

4/13

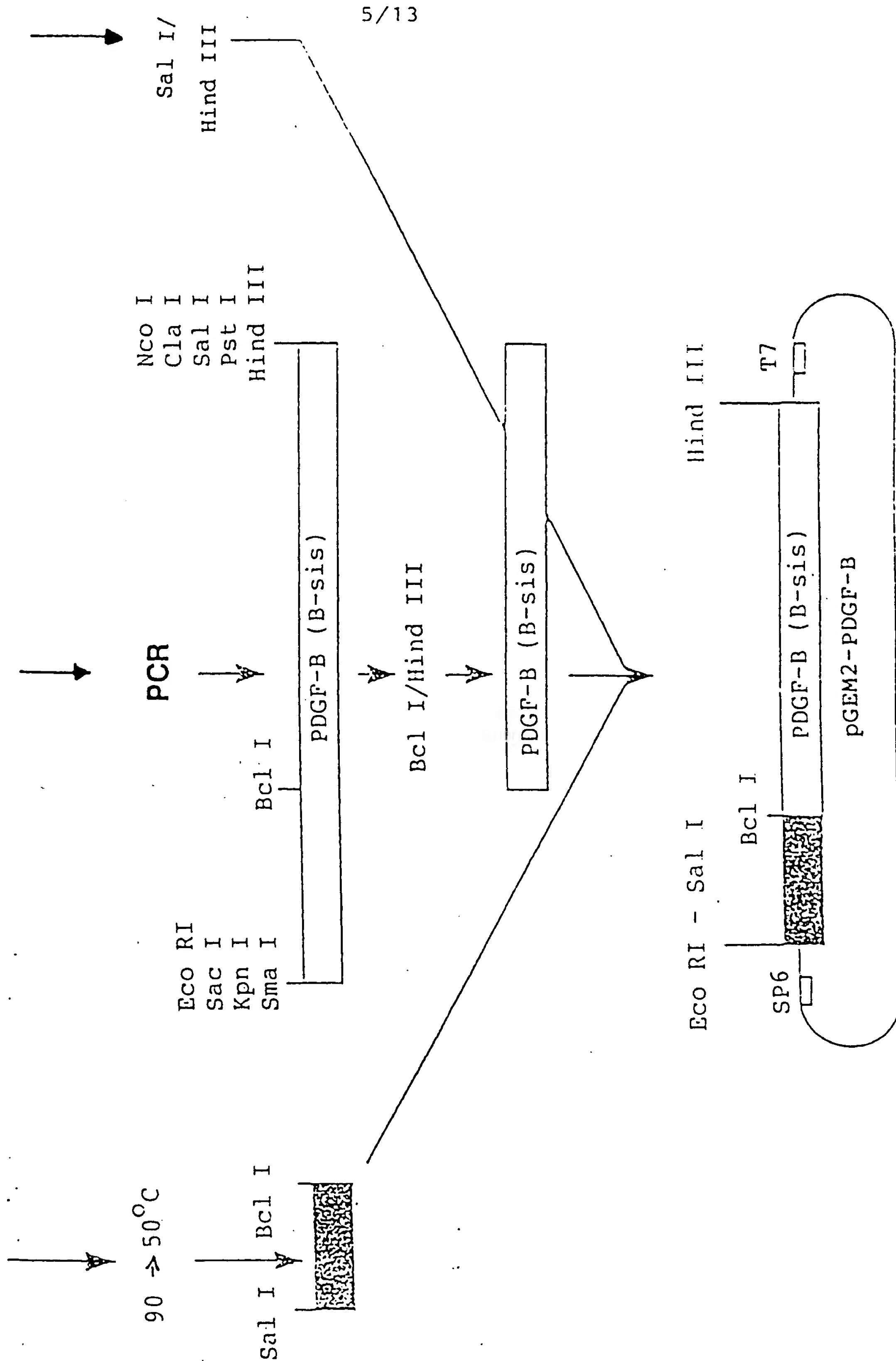


(Fortsetzung  
Figur 3b)

Figur 3a

PPDGF-B1  
PPDGF-B2

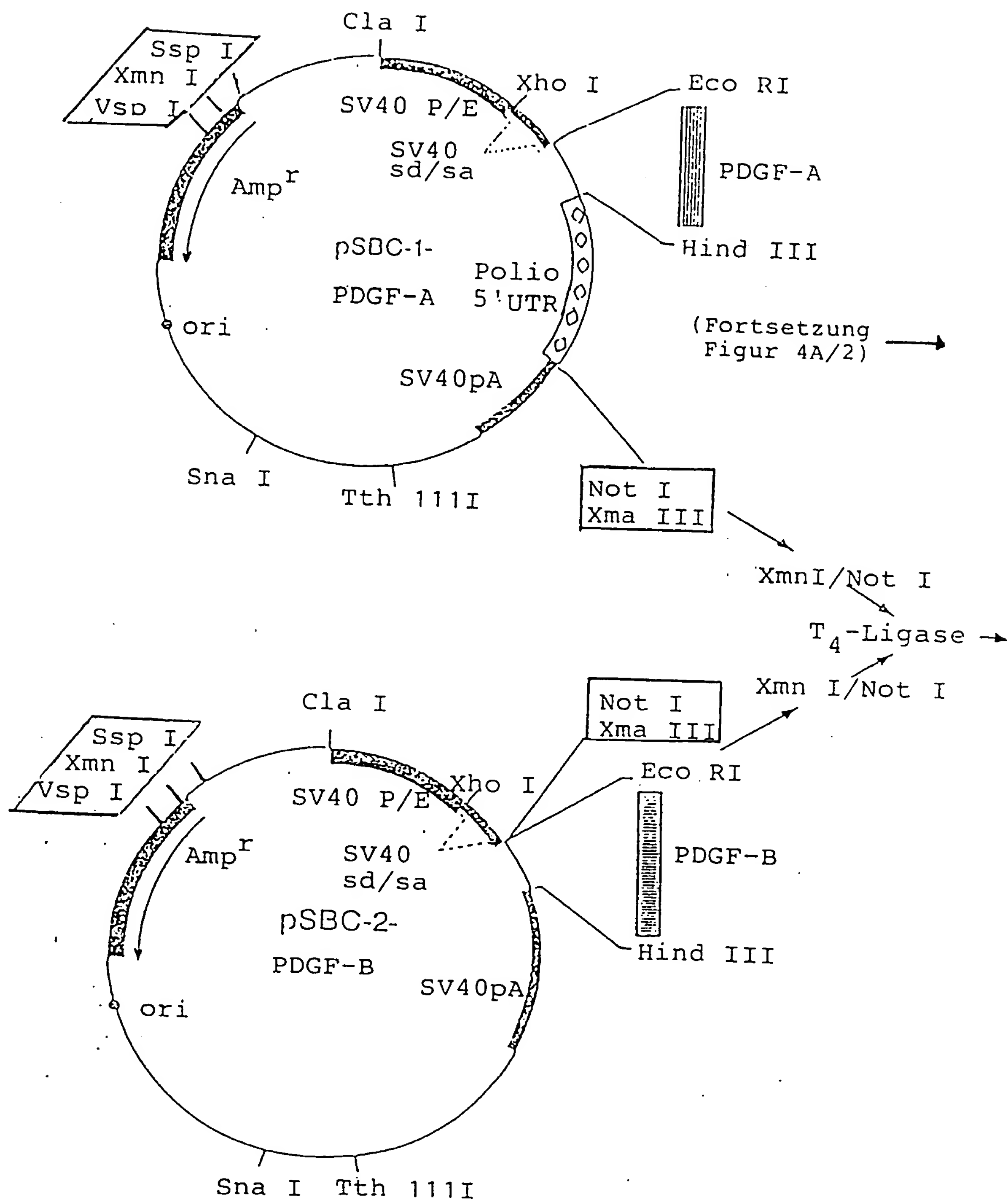
Figur 3b



5/13

6/13

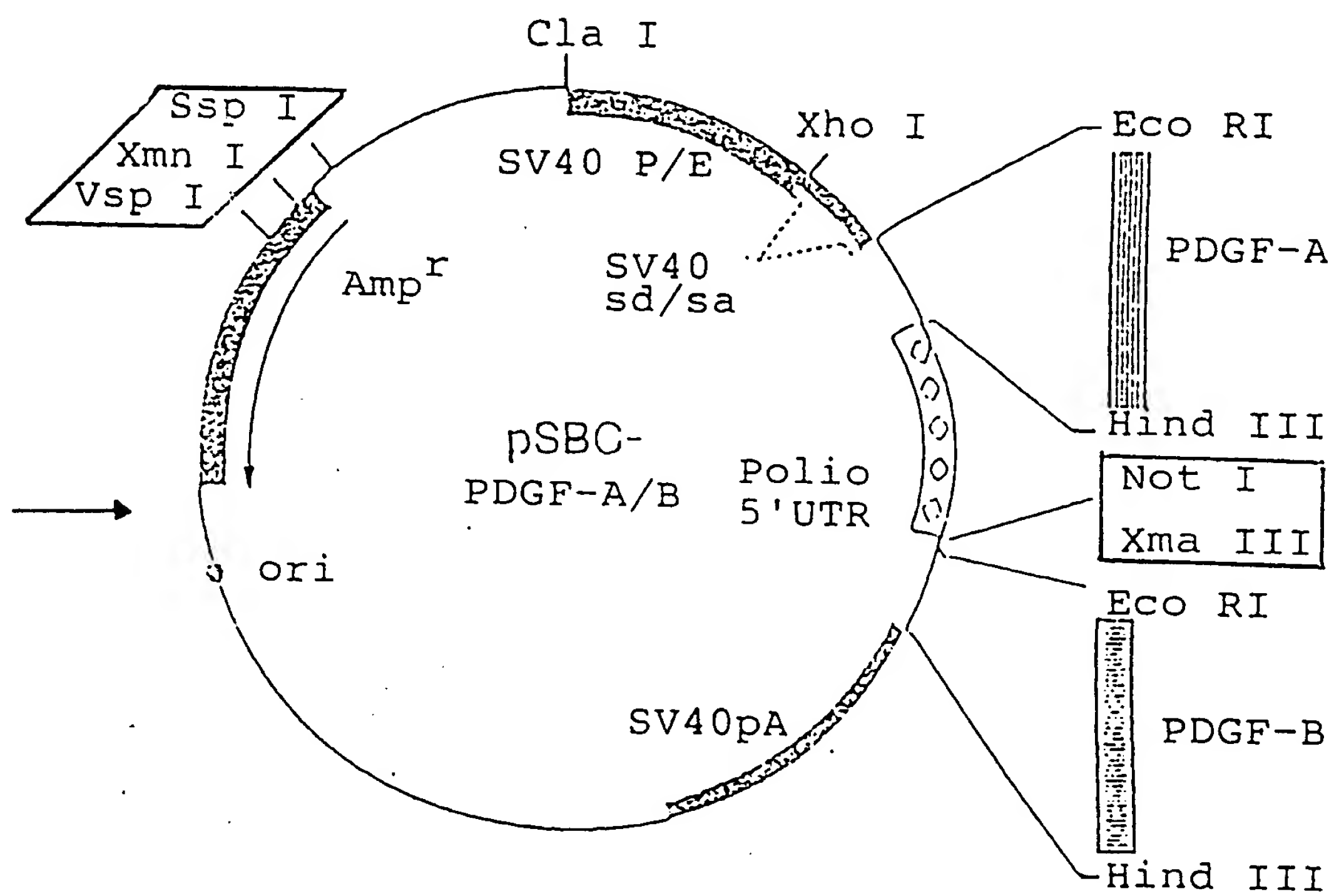
Figur 4A/1





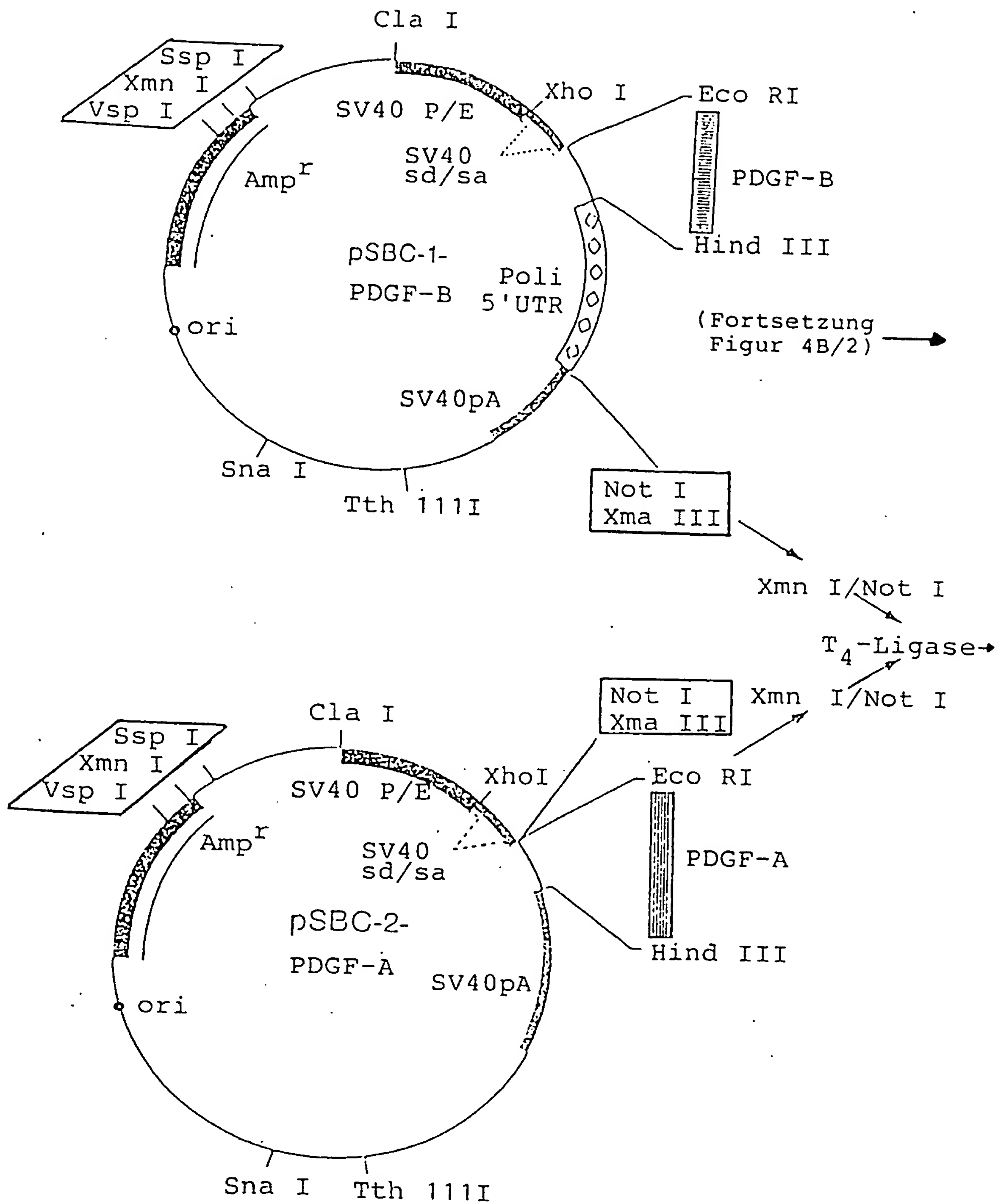
7/13

Figur 4A/2



8/13

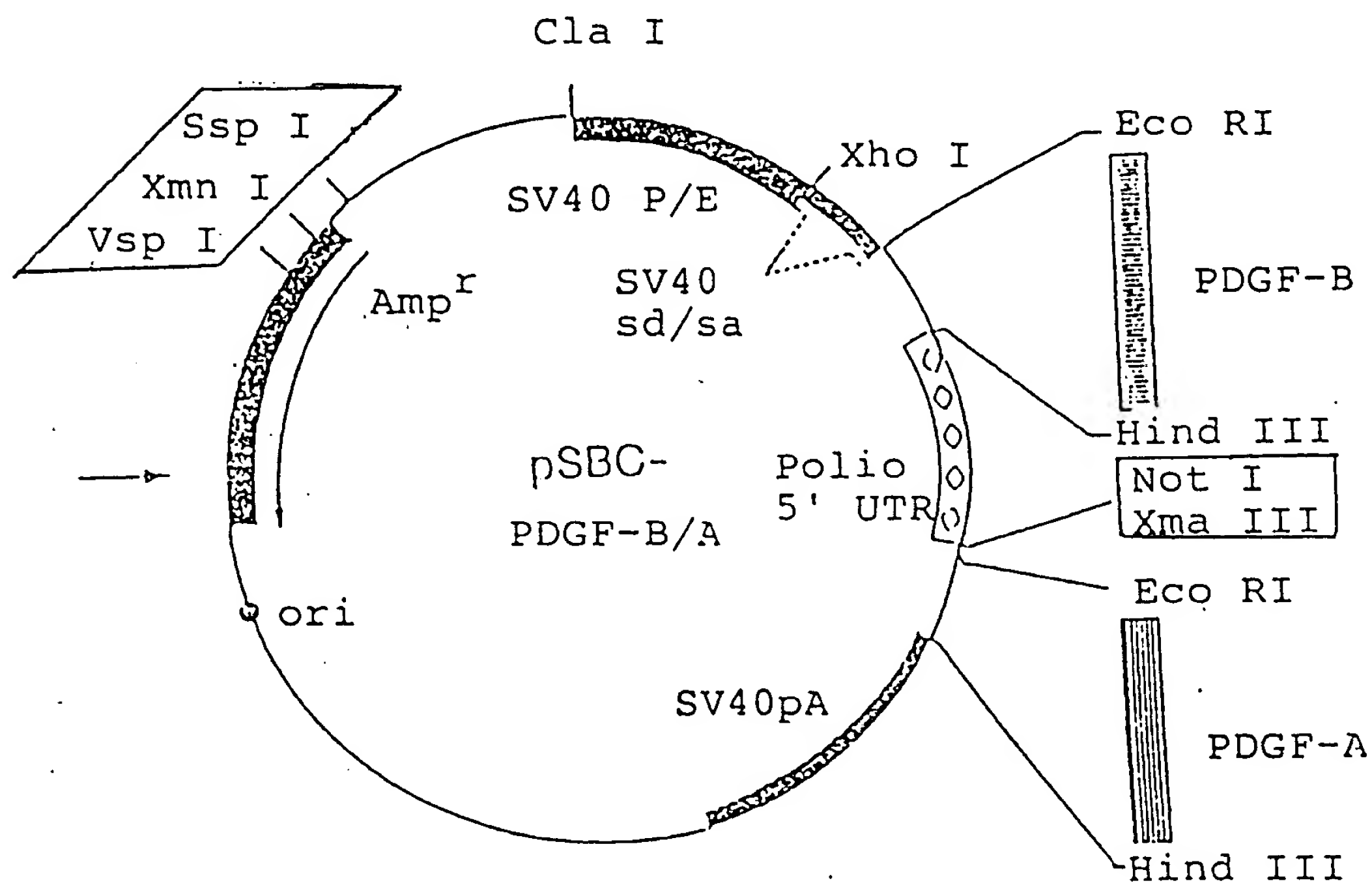
Figur 4B/1



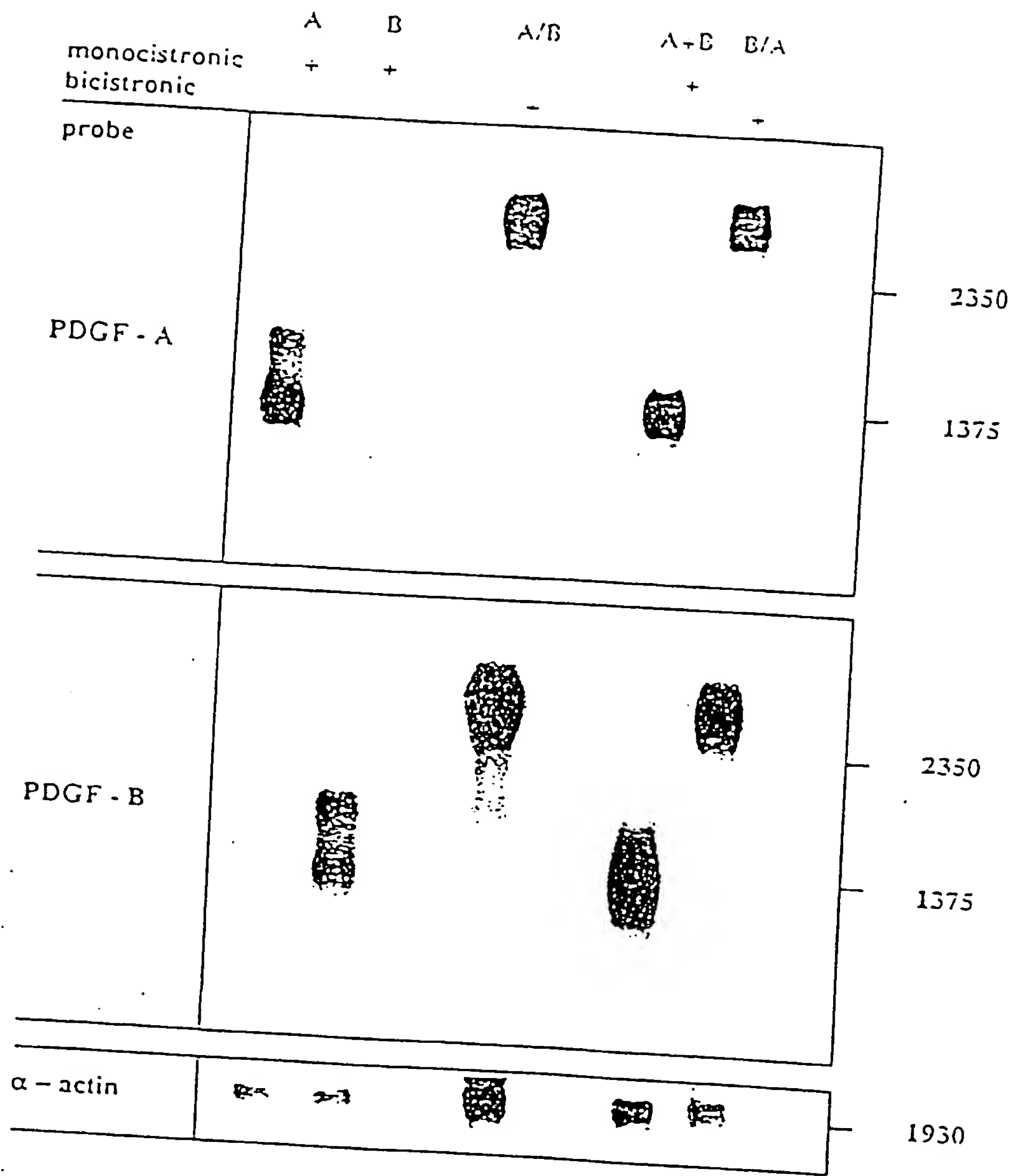
ERSATZBLATT

9/13

Figur 4B/2



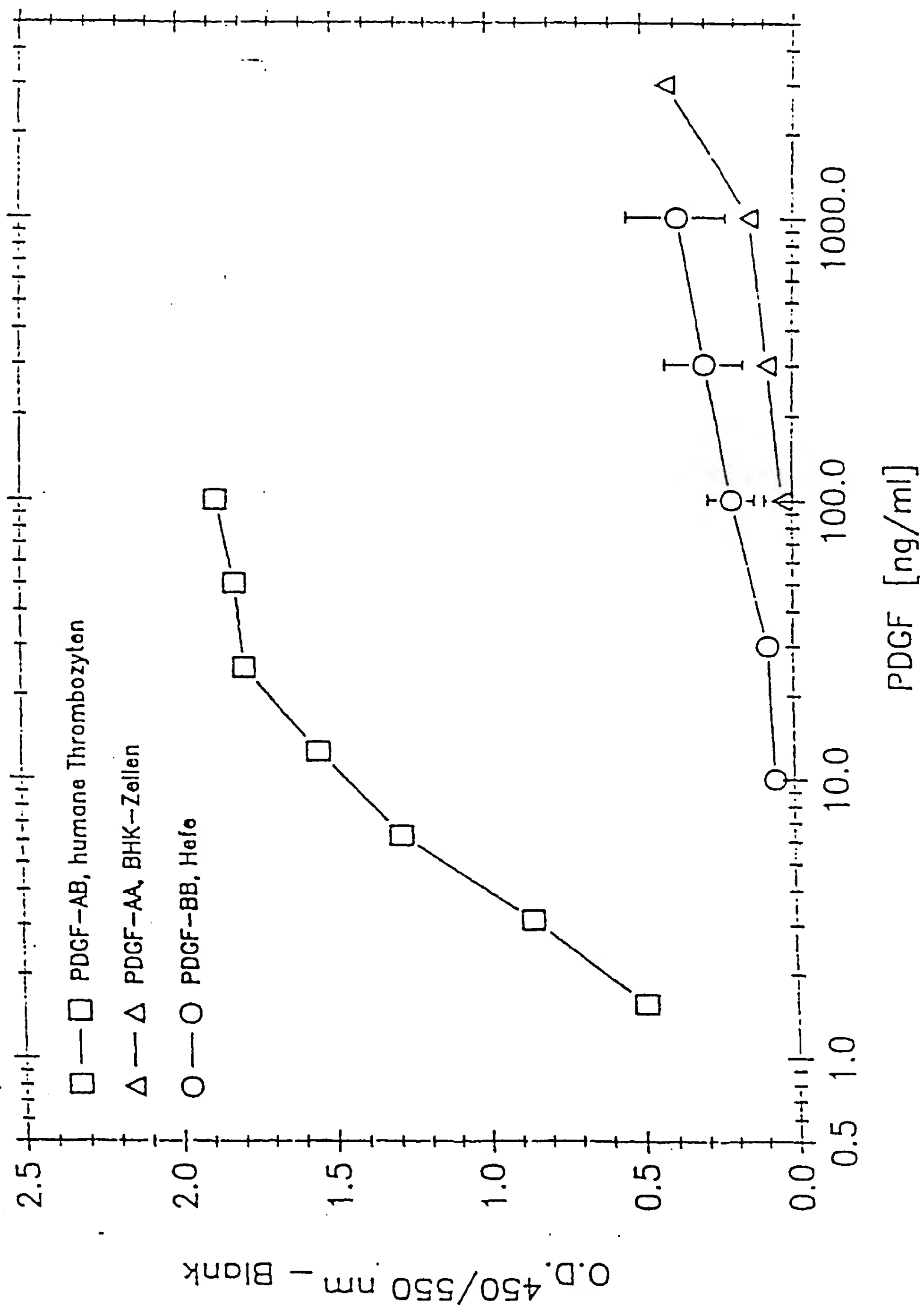
Figur 5



Figur 6

PDGF-AB-ELISA (B-spez. monokl. Antikörper + polykl. Anti-PDGF-AA):

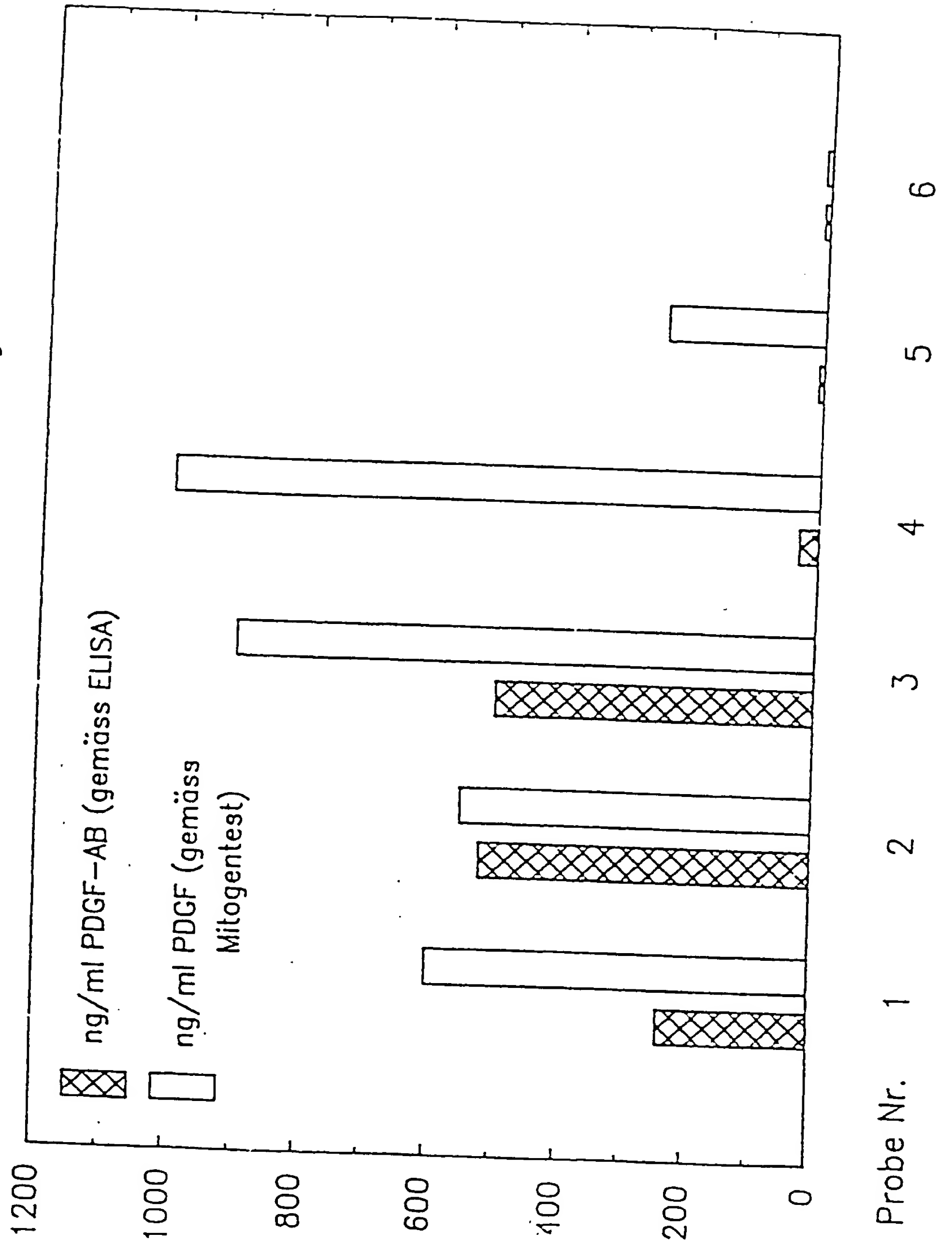
Eichkurven von PDGF-Standards



12/13

Figur 7

Kulturüberstände von rekomb. BHK-Zellen: Daten aus dem ELISA und aus dem Mitogentest

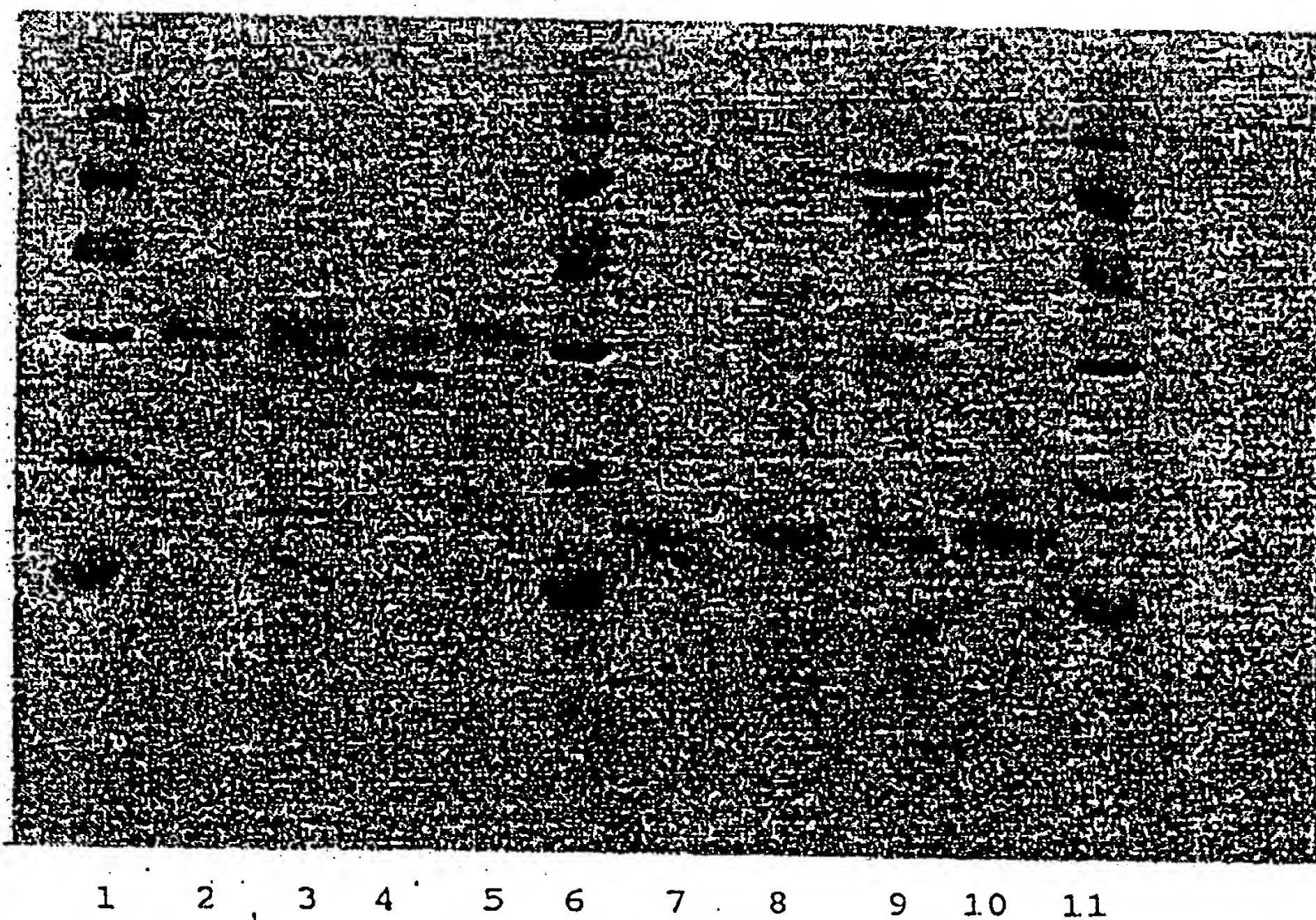


13/13

Figur 8

--

Analyse von gereinigtem PDGF über SDS-PAGE





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/EP 93/02295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/85 C07K13/00  
A61K37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | EP,A,0 259 632 (ZYMOGENETICS, INC.) 16<br>March 1988<br>cited in the application   | 13-18                 |
| Y          | see page 12, line 29 - line 35; claims<br>1-36; figures 1-8  | 1-4                   |
| X          | J. BIOL. CHEM.<br>vol. 263, no. 31, 5 November 1988, AM.<br>SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US;<br>pages 16202 - 16208<br>A. OSTMAN ET AL. 'Synthesis and assembly<br>of a functionally active recombinant<br>platelet-derived growth factor AB<br>heterodimer'<br>cited in the application<br>see page 16205, right column, line 12 -<br>page 16207, right column, line 17; figure<br>1 | 13-15                 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 1993

Date of mailing of the international search report

16 - NOV 1993

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y          | WO,A,90 01550 (ZYMOGENETICS, INC.) 22<br>February 1990<br>cited in the application<br>see page 7, line 15 - page 8, line 10;<br>claims 1-15<br>---  | 1-4                   |
| A          | WO,A,90 08163 (HOPPE, J.) 26 July 1990<br>cited in the application<br>insgesamt<br>---  | 13-18                 |
| A          | EUR. J. BIOCHEM.<br>vol. 185, no. 1, October 1989, SPRINGER<br>VERLAG, BERLIN, BRD;<br>pages 135 - 140<br>W. EICHNER ET AL. 'Large-scale preparation<br>of recombinant platelet-derived growth<br>factor AA secreted from recombinant baby<br>hamster kidney cells'<br>cited in the application<br>insgesamt<br>--- | 13-15                 |
| P,Y        | WO,A,93 03143 (ANDERSON, W., MORGAN, R.A.,<br>COUTURE, L.) 18 February 1993<br>see page 5, line 15 - page 9, line 17<br>-----   | 1-4                   |

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP-A-0259632                              | 16-03-88            | US-A- 4766073              | 23-08-88            |
|   |                     | US-A- 4849407              | 18-07-89            |
|   |                     | US-A- 4845075              | 04-07-89            |
|   |                     | US-A- 4889919              | 26-12-89            |
|   |                     | AU-A- 7681687              | 18-02-88            |
|   |                     | AU-B- 641816               | 30-09-93            |
|   |                     | AU-B- 8695791              | 19-03-91            |
|   |                     | JP-A- 63119682             | 24-05-88            |
|   |                     | US-A- 5128321              | 07-07-92            |
|   |                     | US-A- 5187263              | 16-02-93            |
| WO-A-9001550                              | 22-02-90            | AU-A- 4036389              | 05-03-90            |
|   |                     | EP-A- 0426744              | 15-05-91            |
|   |                     | JP-T- 4500004              | 09-01-92            |
| WO-A-9008163                              | 26-07-90            | DE-A- 3900770              | 26-07-90            |
|   |                     | AU-A- 4836790              | 13-08-90            |
|   |                     | EP-A- 0453456              | 30-10-91            |
|   |                     | JP-T- 4504407              | 06-08-92            |
| WO-A-9303143                              | 18-02-93            | NONE                       |                     |

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/85 C07K13/00  
A61K37/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| X         | EP, A, 0 259 632 (ZYMOGENETICS, INC.) 16. März 1988<br>in der Anmeldung erwähnt  | 13-18              |
| Y         | siehe Seite 12, Zeile 29 - Zeile 35;<br>Ansprüche 1-36; Abbildungen 1-8<br>---   | 1-4                |
| X         | J. BIOL. CHEM.<br>Bd. 263, Nr. 31, 5. November 1988, AM.<br>SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US;<br>Seiten 16202 - 16208<br>A. OSTMAN ET AL. 'Synthesis and assembly<br>of a functionally active recombinant<br>platelet-derived growth factor AB<br>heterodimer'<br>in der Anmeldung erwähnt<br>siehe Seite 16205, rechte Spalte, Zeile 12<br>- Seite 16207, rechte Spalte, Zeile 17;<br>Abbildung 1<br>---<br>-/- | 13-15              |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\* 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\* 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\* 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\* 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\* 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\* 'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\* 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\* 'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\* 'A' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. November 1993

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17-12-1993

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|---|--------------------|
| Y         | WO,A,90 01550 (ZYMOGENETICS, INC.) 22.<br>Februar 1990<br>in der Anmeldung erwähnt<br>siehe Seite 7, Zeile 15 - Seite 8, Zeile<br>10; Ansprüche 1-15<br>---   | 1-4                |
| A         | WO,A,90 08163 (HOPPE, J.) 26. Juli 1990<br>in der Anmeldung erwähnt<br>insgesamt<br>---   | 13-18              |
| A         | EUR. J. BIOCHEM.<br>Bd. 185, Nr. 1, Oktober 1989, SPRINGER<br>VERLAG, BERLIN, BRD;<br>Seiten 135 - 140<br>W. EICHNER ET AL. 'Large-scale preparation<br>of recombinant platelet-derived growth<br>factor AA secreted from recombinant baby<br>hamster kidney cells'<br>in der Anmeldung erwähnt<br>insgesamt<br>--- | 13-15              |
| P,Y       | WO,A,93 03143 (ANDERSON, W., MORGAN, R.A.,<br>COUTURE, L.) 18. Februar 1993<br>siehe Seite 5, Zeile 15 - Seite 9, Zeile<br>17<br>-----  | 1-4                |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02295

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP-A-0259632                                       | 16-03-88                      | US-A- 4766073                     | 23-08-88                      |
|  |                               | US-A- 4849407                     | 18-07-89                      |
|  |                               | US-A- 4845075                     | 04-07-89                      |
|  |                               | US-A- 4889919                     | 26-12-89                      |
|  |                               | AU-A- 7681687                     | 18-02-88                      |
|  |                               | AU-B- 641816                      | 30-09-93                      |
|  |                               | AU-B- 8695791                     | 19-03-91                      |
|  |                               | JP-A- 63119682                    | 24-05-88                      |
|  |                               | US-A- 5128321                     | 07-07-92                      |
|  |                               | US-A- 5187263                     | 16-02-93                      |
| WO-A-9001550                                       | 22-02-90                      | AU-A- 4036389                     | 05-03-90                      |
|  |                               | EP-A- 0426744                     | 15-05-91                      |
|  |                               | JP-T- 4500004                     | 09-01-92                      |
| WO-A-9008163                                       | 26-07-90                      | DE-A- 3900770                     | 26-07-90                      |
|  |                               | AU-A- 4836790                     | 13-08-90                      |
|  |                               | EP-A- 0453456                     | 30-10-91                      |
|  |                               | JP-T- 4504407                     | 06-08-92                      |
| WO-A-9303143                                       | 18-02-93                      | KEINE                             |                               |